

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos
sobre cepas bacterianas tipo y aislados clínicos multirresistentes**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

MIGUEL ANGEL LLUMIQUINGA LLUMIQUINGA

Quito, 2017

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas, del Sr. Miguel Angel Llumiquinga Llumiquinga ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera

Directora de la Disertación

Quito, 25 de enero de 2017

A Dios y a mis padres: María y Miguel

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la sabiduría necesaria para permitirme llegar hasta este momento y por concederme unos excelentes padres que siempre confiaron en mí a pesar de cualquier circunstancia. A mi familia por el constante apoyo y el gran ejemplo de vida que han constituido a lo largo de los años.

A la Mtr. Miryan Rivera por el apoyo incondicional que me supo dar desde que ingresé a su laboratorio, por la guía y dirección en el transcurso del presente estudio, por ser un gran ejemplo de lucha y perseverancia.

A la Dra. Iliana Alcocer por su disponibilidad y continuo apoyo brindados durante esta etapa, pero sobre todo por haber sembrado en mí la pasión por el fascinante mundo de la Microbiología.

A la Mtr. Mercedes Rodríguez-Riglos por brindarme las facilidades necesarias durante el desarrollo de esta investigación. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el apoyo financiero y logístico.

A todo el personal del laboratorio de Microbiología, en especial a Fernanda Yauri por su importante ayuda y facilidades brindadas durante mi estancia ahí. A David Ortega y sobre todo a Nathy Espinel por ser un apoyo constante.

De manera especial a Carolina Portero por ser una guía determinante en este proceso, pero sobre todo por su valiosa y gran amistad brindada. A todos quienes forman parte del laboratorio de Biotecnología Vegetal dirigido por la M.Sc. Alexandra Narváez por ayudarme desinteresadamente en las lecturas de mis placas de microtitulación en especial a Stephy y Carito.

Al personal de la Sala de Preparaciones de la Escuela de Ciencias Biológicas, de manera especial a Doña Rosita por su predisposición a ayudarme en todos los imprevistos que suelen haber.

Al personal del laboratorio de Herpetología del Museo QCAZ, de manera especial al Dr. Santiago Ron y al Lic. Fernando Ayala por su colaboración con el permiso de colección y las identificaciones taxonómicas.

A Yerka Salgado, Mauricio Vallejo y Nicolás Del Castillo por su enorme ayuda brindada en las salidas al campo.

Un enorme agradecimiento a Ailin Blasco por brindarme la experiencia necesaria para desenvolverme en el mundo investigativo, por sus consejos, el apoyo y sobre todo por su invaluable amistad.

A los compas de las biomoléculas: Vero Andrade, Eli Vásquez, Mile Garzón, Andre Vargas, Vero Jara, Nathy Duque, Vale Cajiao, Vivi Jaramillo, Mabe Trujillo, Sofía Yumiseba, Isabel Cipriani Alejo Carrera, Dany Chávez y Santiago García.

A mis queridos amigos por su alegría y compañía Eli, Jovis, Pame, Fer y en especial a Anita Belén, Gabychuela, Alejilla y JuanPa, gracias por estar conmigo permanentemente y por todos los gratos recuerdos.

Finalmente, a todo ese batallón de voluntarios, becarios y pasantes que han pasado por el laboratorio y me han ayudado con el cuidado y manteniendo de mis ranitas: Heisel Ricaurte, Kattito Hinojosa, David Espinel, Dani Valencia, Liz Montero, Tati Camacho, Cris Jaramillo, Malki, Sheyla, Majo Quiroz, Mariany Duque, Pao Chávez, Sebas Tobar, Jaime Gavidia, Bryan Rojas. Muchas Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
	3.1.1. OBJETIVOS.....	7
	3.1.1.1. OBEJTIVO GENERAL.....	7
	3.1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
	4.1.1. ESPECÍMENES DE ANFIBIOS A ANALIZARSE.....	9
	4.1.2. EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANFIBIOS..	10
	4.1.3. PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC.....	10
	4.1.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	11
	4.1.5. EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS.....	12
	4.1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).....	13
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
	5.1.1. ESPECÍMENES DE ANFIBIOS ANALIZADOS.....	14
	5.1.2. EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANFIBIOS..	14
	5.1.3. PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE ANUROS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC.....	16

5.1.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	18
5.1.5.	EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS.....	20
5.1.6.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).....	21
6.	CONCLUSIONES.....	22
7.	RECOMENDACIONES.....	23
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
9.	FIGURAS.....	27
10.	TABLAS.....	38
11.	ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de secreciones cutáneas de anfibios.....	27
Figura 2. Validación de <i>Salmonella</i> Enteritidis mediante pruebas bioquímicas.....	28
Figura 3. Prueba de difusión por disco de <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880.....	29
Figura 4. Prueba de difusión por disco de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	30
Figura 5. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de <i>Rana</i> sp. sobre aislados clínicos multirresistentes de <i>Serratia marcescens</i>	31
Figura 6. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de <i>Rana</i> sp. sobre aislados clínicos multirresistentes de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figura 7. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de <i>Rana</i> sp.....	33
Figura 8. Porcentaje de hemólisis de la secreción de <i>Rana</i> sp., en muestras sanguíneas de hombre y mujer.....	33
Figura 9. Perfil cromatográfico de <i>Gastrotheca</i> sp.....	34
Figura 10. Perfil cromatográfico de <i>Hypsiboas pellucens</i>	34
Figura 11. Perfil cromatográfico de <i>Hypsiboas rosenbergi</i>	35
Figura 12. Perfil cromatográfico de <i>Rana</i> sp.....	35
Figura 13. Perfil cromatográfico de <i>Oophaga sylvatica</i> (morfotipo anaranjado).....	36
Figura 14. Perfil cromatográfico de <i>Oophaga sylvatica</i> (morfotipo rojo).....	36
Figura 15. Perfil cromatográfico de <i>Smilisca phaeota</i>	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de individuos colectados en la salida al campo de 2014.....	38
Tabla 2. Lista de individuos colectados en la salida al campo de 2015.....	40
Tabla 3. Especies de anfibios de los que se obtuvo secreciones cutáneas.....	41
Tabla 4. Registro de las pruebas bioquímicas para la confirmación de las especies de bacterias ATCC.....	43
Tabla 5. Datos de origen de los aislados clínicos de <i>Serratia marcescens</i> analizados.....	44
Tabla 6. Datos de origen de los aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> analizados....	45
Tabla 7. Número total de extracciones cutáneas realizadas.....	46
Tabla 8. Diámetros del halo inhibición de las pruebas de difusión por disco en bacterias ATCC.....	47
Tabla 9. Medidas de absorbancia a 630 nm de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de la secreción de <i>Rana</i> sp. frente a cepas multirresistentes de <i>Serratia marcescens</i>	48
Tabla 10. Medidas de absorbancia a 630 nm de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de la secreción de <i>Rana</i> sp. frente a cepas multirresistentes de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la secreción de cutánea <i>Rana</i> sp.....	50
Tabla 12. Perfil de susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a antibióticos y a la secreción cutánea de <i>Rana</i> sp.....	51

Tabla 13. Porcentaje de hemólisis de la secreción de <i>Rana</i> sp., en muestras sanguíneas de hombre y mujer.....	52
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de poro de barril.....	53
Anexo 2. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de formación de poro toroidal.....	54
Anexo 3. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de alfombra	55
Anexo 4. Permiso de investigación científica N° 005-14 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente.....	56
Anexo 5. Permiso de investigación científica N° 003-15 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente.....	58
Anexo 6. Filogenia de anfibios que muestra la distribución de compuestos presentes en su piel.....	60

1. RESUMEN

Según el primer informe mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la resistencia a los antibióticos, la salud pública podría estar atravesando una era pos-antibiótica; en la cual, el uso indiscriminado de este tipo de compuestos, ha facilitado a los microorganismos el desarrollo de resistencia, por lo que la búsqueda de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, resulta transcendental en la época actual. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) procedentes de la piel de anfibios han demostrado ser efectivos contra un amplio espectro de microorganismos. En consecuencia, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de ocho especies de anuros ecuatorianos pertenecientes a las familias Bufonidae, Dendrobatidae, Hemiphractidae, Hylidae y Ranidae, sobre cepas bacterianas tipo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (“American Type Culture Collection”, ATCC) y aislados clínicos multirresistentes. Para ello se realizaron pruebas de difusión en disco y de microdilución en caldo, de acuerdo a los parámetros sugeridos por el CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”). Con las secreciones cutáneas que presentaron actividad antimicrobiana se realizaron pruebas hemolíticas, para medir el daño celular que podrían causar a los eritrocitos humanos. Adicionalmente, se realizaron Cromatografías Líquidas de Alta Eficacia (HPLC) para corroborar la presencia de AMPs en las secreciones cutáneas totales. Los resultados de los antibiogramas sobre cepas ATCC mostraron actividad antimicrobiana de las secreciones de dos especies de anuros *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae) y *Rana* sp. (Ranidae) sobre *Serratia marcescens* ATCC 13880 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a concentraciones de 4000 y 2000 µg/ml. Sin embargo, en los ensayos de microdilución se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 7,82 µg/ml para la secreción cutánea de *Rana* sp. sobre 12 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina (CORSA). El porcentaje de hemólisis observado a dicha concentración fue de 2.87%. El análisis del cromatograma para dicha secreción muestra moléculas con alta concentración en los minutos 50.3, 59.7 y 62.5. Estos resultados comprueban el efecto antimicrobiano de las secreciones cutáneas de anuros ecuatorianos, con compuestos bioactivos que podrían ser usados como fuente alternativa a los antibióticos convencionales.

Palabras clave: anfibios, concentración mínima inhibitoria, péptidos antimicrobianos, resistencia bacteriana, secreciones cutáneas.

2. ABSTRACT

According to the first world report of the World Health Organization (WHO) about the resistance to antibiotics, the public health could be crossing a post-antibiotic era; in which, the indiscriminate use of this type of compounds, has facilitated micro-organisms development of resistance. Thus, the search for bioactive compounds with antimicrobial properties is transcendental at the current time. Antimicrobial peptides (AMPs) from the skin of amphibians have proven to be effective against a broad spectrum of microorganisms. Reason why the aim of this study is to evaluate the antimicrobial potential of total skin secretion of eight ecuadorian anuran species belonging to the families Bufonidae, Dendrobatidae, Hemiphractidae, Hylidae and Ranidae, on bacterial strains from American Type Culture Collection (ATCC) and multidrug-resistant clinical isolates. Diffusion testing disk and microdilution broth were performed according to the parameters suggested by the CLSI ("Clinical and Laboratory Standards Institute"). Hemolytic tests were performed on cutaneous secretions with antimicrobial activity to measure cell damage that could cause to human erythrocytes. In addition, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were conducted to corroborate the presence of AMPs in total skin secretions. The results of the antibiograms of strains ATCC showed antimicrobial activity of the secretions from two species of anurans *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae) and *Rana sp.* (Ranidae) on *Serratia marcescens* ATCC 13880 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, at concentrations of 4000 and 2000 µg/ml. However, the microdilution tests yield a minimum inhibitory concentration of 7.82 µg/ml for the skin secretion of *Rana sp.* over 12 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin (CORSA). The percentage of hemolysis observed at this concentration was 2.87%. The analysis of the chromatogram to the secretion shows molecules with high concentration in the minutes 50.3; 59.7 and 62.5. This results suggest an antimicrobial effect of skin secretions of ecuadorian anurans, with bioactive compounds that could be used as an alternative to conventional antibiotics.

Key words: anurans, minimum inhibitory concentration, antimicrobial peptides, bacterial resistance, skin secretions.

3. INTRODUCCIÓN

La piel de los anfibios se caracteriza por tener numerosas glándulas granulares serosas y mucosas que se distribuyen en gran medida en el dorso del animal. Como parte del sistema inmune innato dichas glándulas secretan alcaloides, esteroides, aminos biogénicos, péptidos y proteínas (Conlon, 2004). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son predominantes en las secreciones cutáneas y los ayudan a protegerse de patógenos y depredadores a través de su acción básicamente citolítica. Estas moléculas de defensa codificadas por genes, están comprendidas entre ocho hasta 63 residuos aminoácídicos, de los cuáles al menos el 50% son hidrofóbicos como la leucina y la isoleucina (Conlon y Mechkarska, 2014). La mayoría de AMPs son catiónicos debido a la presencia de múltiples residuos de lisina. Estas características les permiten interactuar directamente con las membranas microbianas (Conlon, 2011).

En general las propiedades físicas de los AMPs provenientes de distintos organismos resultan similares, poseen homologías en sus secuencias muy limitadas y forman una amplia gama de estructuras secundarias, destacando: dos a cuatro hojas β -plegadas, α -hélices, estructuras en forma de bucle y estructuras extendidas (Jenssen, Hamill y Hancock, 2006). Respecto a los péptidos catiónicos provenientes de anfibios, se ha demostrado que en soluciones acuosas carecen de estructura secundaria estable, pero tienden a formar una α -hélice anfipática cuando interactúan con las membranas formando una vesícula fosfolipídica (Powers y Hancock, 2003).

Este diseño anfipático de los AMPs les permiten matar a los microorganismos mediante procesos donde no intervienen receptores, lisando las bacterias por permeabilización de su membrana que está compuesta a su vez de lípidos anfipáticos (Shai, 2002), mientras que otros se dirigen a constituyentes bacterianos aniónicos como ácidos nucleicos, componentes proteicos y citoplasmáticos (Brodgen, 2005).

Las estructuras secundarias anfipáticas en las que los residuos se segregan en regiones hidrófobas y catiónicas son quizás el mecanismo de acción bactericida más generalizado de los AMPs (Zasloff, 2002), pero a su vez la naturaleza de las interacciones AMP-membrana sigue siendo controvertida y debatida ampliamente; por lo que se han

propuesto una variedad de mecanismos, entre los que se destacan: la formación de poros en forma de barril, poros toroidales y el modelo de alfombra.

La formación de poros en forma de barril se da luego de la interacción con la membrana, debido al posicionamiento de los aminoácidos cargados positivamente cerca de la cabeza de los fosfolípidos. Cuando el péptido unido alcanza una concentración umbral, los monómeros peptídicos se autoagregan e insertan más en la membrana de forma perpendicular quedando las superficies hidrófobas de los péptidos hacia fuera, mientras que las superficies hidrófilas forman el revestimiento de poro. La conformación de estos poros a menudo es irregular en tamaño y duración, lo que ocasiona una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana (Jenssen et al., 2006) (Anexo 1).

Uno de los mecanismos mejor estudiado es el del poro toroidal o agujero de gusano. En este modelo, los lípidos se intercalan con el péptido en el canal transmembranal formando un complejo supramolecular en el cual el poro que atraviesa la membrana se encuentra revestido con superficies de péptidos polares, así como con las cabezas de los fosfolípidos. En este modelo, los péptidos en el ambiente extracelular toman una estructura α -hélice cuando interactúan con la membrana bacteriana. Las hélices en un comienzo se orientan paralelamente a la superficie de la membrana, debido a un umbral de relación péptido-lípido (por ejemplo, 1:30 para magainina). Aquí las hélices pueden comenzar a auto-asociarse, de tal manera que sus residuos polares no queden expuestos a las cadenas hidrocarbonadas de la membrana. Este compuesto transitorio y multimérico forma el complejo péptido-lípido conocido como poro supramolecular o toroidal. Tras la desintegración del poro, algunos péptidos se trasladan al citoplasma, lo que sugiere que el desmontaje del poro toroidal puede ser un mecanismo clave por el cual los péptidos acceden a posibles dianas intracelulares (Yeaman y Yount, 2003) (Anexo 2).

En el modelo de alfombra, se acumula una alta densidad de AMPs sobre la superficie de la membrana bacteriana (Anexo 3). Al igual que en los otros modelos, los péptidos inicialmente se unen a la membrana a través de interacciones electrostáticas con la bicapa de fosfolípidos. Sin embargo, no existe estructura secundaria o cuaternaria específica en este mecanismo de acción, de este modo, cuando se alcanza una concentración de péptido umbral, la membrana se ve sometida a condiciones desfavorables perdiendo su integridad. La disolución de la membrana se produce de tal forma que no

implica la formación de canales, y los péptidos no se insertan necesariamente en la membrana (Zasloff, 2002).

Los AMPs se pueden agrupar en familias de acuerdo a similitudes presentes en la secuencia de aminoácidos. Secreciones cutáneas de la piel de una sola especie de anfibio a menudo presentan varios AMPs pertenecientes a una familia de péptidos en particular que se cree se han originado de varias duplicaciones de un gen ancestral (Conlon, y Mechkarska, 2014), sugiriendo que los AMPs están bajo selección positiva (Vanhoye, Bruston, Nicolas y Amiche 2003).

Se han descrito hasta el momento 1021 AMPs (Wang, Li y Wang, 2016) provenientes de la piel de ranas pertenecientes a las familias Alytidae, Bombinatoridae, Hylidae, Hyperoliidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae, Pipidae y Ranidae (Conlon y Mechkarska, 2014).

Las ranas de la familia Hylidae han demostrado ser una rica fuente de AMPs, que pueden agruparse en cinco familias principales en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos. Estos son las dermaseptinas, phylloseptinas, plasticinas, dermatoxinas y algunos péptidos huérfanos que no han sido incluidos en estos grupos. Los miembros de estas familias difieren considerablemente en estructuras primarias y actividades biológicas, pero la conservación de secuencias señal de aminoácidos y proregiones N-terminales de precursores de biosíntesis, demuestran que están relacionados evolutivamente (Conlon, 2011).

El repertorio de AMPs en las secreciones de la piel de individuos de la familia Ranidae es extremadamente diversa. Se mencionan brevininas, esculentinas, japonicanas, nigrocinas, palustrinas, ranaciclinas, ranatuerinas y temporinas. En este contexto, una familia de péptidos constituye un grupo de moléculas con características estructurales comunes que se han encontrado en más de una especie. Los péptidos de las familias brevinin-1 y temporinas tienen la distribución más amplia, encontrándose en la mayoría de las especies de Eurasia y del Nuevo Mundo. Las actividades antibacterianas y antifúngicas de amplio espectro de éstos péptidos, por ejemplo esculentina-1, junto con su actividad hemolítica relativamente baja, los convierten en candidatos para el desarrollo en agentes terapéuticamente útiles (Conlon, 2011).

Estudios tanto clínicos como en laboratorio, han mostrado que el surgimiento de resistencia contra los AMPs es menos probable que los observados para los antibióticos (Perron, Zasloff, y Bell 2006). Los intentos de inducir resistencia en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por mutagénesis química no han tenido éxito, mostrando que no hay evidencia de resistencia cruzada entre AMPs y cualquier antibiótico en uso clínico (Zaslof, 2002).

Debido a que el objetivo de los AMPs es la membrana bacteriana, un microorganismo tendría que rediseñarla para generar resistencia, cambiando la composición y organización de sus lípidos lo que implicaría un alto “costo” para la mayoría de las especies microbianas. Además, se ha visto que los AMPs pueden aumentar la potencia de los antibióticos existentes *in vivo*, probablemente facilitando el acceso de antibióticos a la célula bacteriana (Giacometti, Cirioni, Barchiesi y Scalise, 2000).

Según el primer informe mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la resistencia a los antibióticos, la salud pública podría estar atravesando una era pos-antibiótica, en la cual, infecciones leves podrían convertirse en letales debido a que el uso indiscriminado de este tipo de compuestos ha facilitado a los microorganismos el desarrollo de resistencia (OMS, 2014).

Datos de la OMS para la región de las Américas muestran una resistencia microbiana frente a antibióticos de tercera generación en más de la mitad de pacientes portadores de enterobacterias del género *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Serratia* (OMS, 2014).

Ecuador no está exento de esta realidad, que se agrava aún más cuando se trata de patógenos de origen hospitalario, como *Staphylococcus aureus*, donde la resistencia frente al uso de fármacos convencionales se incrementó del 21% al 40% en una década (Zurita, 2012), poniendo de manifiesto que el tratamiento con antibióticos disponibles actualmente, es limitado.

Los programas de desarrollo de nuevas drogas parecen ser insuficientes para proveer fármacos en los futuros 10 a 20 años (Kumarasamy et al., 2010), pudiendo llegar a ser una amenaza para la estabilidad mundial y la seguridad de los países. Es por esto que,

en la Asamblea Mundial de la Salud llevada a cabo en mayo de 2015, se aprobó un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos. Uno de sus objetivos estratégicos planteados fue el de reforzar y aumentar la inversión en alternativas terapéuticas que puedan hacer frente a esta creciente problemática (OMS, 2015).

Estudios previos realizados con anuros ecuatorianos, mostraron una alta eficacia antimicrobiana de secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli*, *Atelopus elegans*, y *Cruziohyla calcarifer* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como frente a aislados clínicos multirresistentes (Caicedo, 2007; Cilveti, Rivera, Rodríguez-Riglos y Alcocer, 2013; Vargas, Pérez, Ortega y Rivera, 2015; Proaño-Bolaños et al., 2016). Sin embargo, el conocimiento de AMPs presentes en anfibios ecuatorianos recién ha empezado a despuntar.

Siendo Ecuador el país con el número más alto de especies de anfibios por unidad de área, con 579 descritas al momento (Ron et al., 2016), resulta relevante analizar las secreciones cutáneas de anfibios antes no testadas, que presenten compuestos bioactivos que podrían ser usados como fuente alternativa a los antibióticos convencionales.

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de ocho especies de anuros ecuatorianos sobre bacterias tipo y aislados clínicos multirresistentes.

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar un screening inicial mediante pruebas de difusión por disco de las secreciones cutáneas totales de ocho especies de anfibios sobre cepas bacterianas tipo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (“American Type Culture Collection”, ATCC) de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*.

Determinar la concentración mínima inhibitoria de las secreciones cutáneas totales que muestren actividad antimicrobiana previa, sobre aislados clínicos multirresistentes de *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*, mediante la técnica de microdilución en caldo.

Evaluar el grado de hemólisis de las secreciones cutáneas totales que presenten actividad antimicrobiana, sobre glóbulos rojos humanos.

Detectar la presencia de péptidos en las secreciones cutáneas totales de las especies estudiadas, a través de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESPECÍMENES DE ANFIBIOS A ANALIZARSE

Se realizaron dos salidas al campo en los años 2014 y 2015 a la provincia de Esmeraldas para recolectar individuos de las especies *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae), *Hypsiboas pellucens* (Hylidae), *Oophaga sylvatica* (Dendrobatidae) morfotipo anaranjado (A) y rojo (R), *Rana* sp. (Ranidae) y *Smilisca phaeota* (Hylidae) con el fin de obtener un número suficiente de especímenes que permitan llevar a cabo el estudio.

La recolecta de especímenes se llevó a cabo con los permisos de investigación científica N° 005-14 IC-FAU-DNB/MA y N° 003-15 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente (Anexos 4 y 5). La primera salida al campo se realizó del 20 al 23 de febrero del 2014, a la zona de Quinge, del Cantón Muisne, coordenadas 00° 42' 51" N / 80° 04' 32" W, y a la zona de Durango, cantón San Lorenzo, coordenadas 01° 02' 31" N / 78° 37' 26" W (Tabla 1). La segunda salida se realizó del 27 al 29 de marzo del 2015, a las zonas de Tundaloma y Durango, coordenadas 1° 10' 53.725" N / 78° 45' 4.71" W cantón San Lorenzo (Tabla 2).

Todos los individuos recolectados fueron transportados vivos hasta el Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) dentro de un cooler, en tarrinas plásticas perforadas y humedecidas que permitieron mantener la cantidad adecuada de temperatura, humedad y oxígeno. Ya en el laboratorio, las ranas fueron colocadas en terrarios individuales y se les proporcionó una dieta basada en grillos provenientes del bioterio de la Balsa de los Sapos de la PUCE.

La identificación de cada individuo se la llevó a cabo por personal especializado del Museo de Zoología de la PUCE (QCAZ).

Adicionalmente, se utilizaron individuos de *Atelopus* sp. (Bufonidae), pertenecientes al proyecto Balsa de los Sapos; de *Gastrotheca* sp. (Hemiphractidae) que

nacieron en cautiverio y de *Trachycephalus jordani* (Hylidae), que son mantenidas en el LICBA (Tabla 3).

Aquellos especímenes que murieron en el desarrollo de la investigación, fueron procesados adecuadamente para ingresarlos al museo QCAZ, en donde se les asignó el correspondiente número de colección QCAZ.

4.2 EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANFIBIOS

Para la obtención de las secreciones cutáneas de la piel de los anfibios recolectados y mantenidos en cautiverio, se aplicaron en el dorso de cada espécimen leves descargas eléctricas intermitentes de aproximadamente seis voltios durante un minuto, utilizando el Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS) diseñado por Grant y Land (2002), (Figura 1A).

Luego se colectaron las secreciones cutáneas mediante un lavado con 10 ml de agua “Milli-Q” de la superficie dorsal de cada rana por tres minutos (Figura 1B). Esta solución se recogió en cajas Petri para ser liofilizada el mismo día de la extracción en el equipo VirTis adVantage Plus con un protocolo estandarizado en el LICBA específicamente para secreciones de anfibios, de una duración de 16,5 horas. El producto del liofilizado fue almacenado a -20 °C.

4.3 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC

Para determinar la susceptibilidad bacteriana a las secreciones cutáneas totales de ocho especies de anfibios se realizaron pruebas de difusión por disco, con agar Müller-Hinton (DIPCO), en cajas Petri desechables (VQIR) de 150*15 mm, analizando cinco concentraciones distintas (4000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml y 250 µg/ml), con tres repeticiones, siguiendo los parámetros sugeridos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (2014).

Los antibiogramas se realizaron con aislados bacterianos controles de, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076,

Serratia marcescens ATCC 13880 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Todas estas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la PUCE y validadas mediante pruebas bioquímicas de Citrato, TSI, MR/VP, SIM, MILI, Úrea, Fenil Alanina, MIO (Figura 3, Tabla 4).

Las diluciones seriadas del extracto liofilizado se realizaron en agua “Milli-Q” conteniendo 0.01% de ácido acético glacial y 0.2% de Suero Albúmina Bovino (BSA, Promega). Para evitar error de pipeteo, se preparó 10 ml de agua “Milli-Q” a los que se añadió 0.02 g de BSA y 1 µl de ácido acético glacial; a partir de esta solución se utilizó la cantidad necesaria para obtener las concentraciones a ensayarse.

Los discos para test de susceptibilidad antimicrobiana (OXOID) se colocaron de manera equidistante con la ayuda de una pinza estéril y se añadió en cada uno de ellos, 12 µl de las respectivas diluciones. Como control positivo se usó secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli* y como control negativo se utilizó la solución en la que se diluyó el péptido (Agua Milli-Q, BSA y ácido acético).

Posterior a esto se incubaron las cajas Petri a 37 °C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición en milímetros, utilizando una regla. En base a los resultados obtenidos por Caicedo (2007), secreciones que formaron halos de inhibición entre 8 y 13 mm, fueron consideradas como positivas.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Para las secreciones que presentaron actividad antimicrobiana en las pruebas de difusión por disco, se realizaron pruebas de microdilución en caldo sobre aislados clínicos de bacterias multirresistentes: *Serratia marcescens* (18) y *Staphylococcus aureus* (12) proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la PUCE (Tabla 5 y 6).

Para determinar la concentración más baja de la secreción cutánea que previene el crecimiento visible de las bacterias (MIC) se siguió el protocolo descrito por Wiegand, Hilpert, y Hancock (2008). Se preparó una solución madre 20x de la secreción cutánea liofilizada, para realizar diluciones seriadas con BSA 0.20% y 0.01% de ácido acético

hasta obtener concentraciones de 4000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.25 µg/ml, 15.63 µg/ml y 7.82 µg/ml. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de poliestireno (COSTAR 3590) de 96 pocillos, en cada uno de los cuales se colocó 10 µl de cada dilución de la secreción y 90 µl de bacteria diluída 1:200 de la escala 0.5 de Mc-Farland, medida en un espectrofotómetro (BioPhotometer *plus*), lo que resulta en un inóculo final de 5×10^5 UFC ml⁻¹. Se incubó durante 18 horas a 37 °C y se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de placas de microtitulación (iMark Bio Rad). Cada ensayo se lo realizó por triplicado.

Como control positivo de crecimiento se colocó 100 µl de bacteria sin secreción y como control negativo, 100 µl de agar Müeller Hilton Broth.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria se obtuvieron regresiones lineales a partir de los promedios de las medidas de absorbancia de cada dilución ensayada, en donde la variable dependiente fue el crecimiento bacteriano y la variable independiente fueron las distintas concentraciones ensayadas.

4.5 EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

De acuerdo al protocolo establecido por Asoodeh, Sepahi y Ghorani- Azam (2014) se requiere una concentración de glóbulos rojos al 5%. Para ello se recogió 2 ml de sangre de hombre y de mujer en tubos que contenían heparina (VACUETTE). Se realizaron tres lavados con 5 ml de solución tamponada fría (PBS 1X Gibco) a 3600 rpm durante 10 min. Las células lavadas se diluyeron hasta un volumen final de 40 ml de PBS.

Para el ensayo hemolítico se añadió 20 µl de cada dilución del péptido y 180 µl de los glóbulos rojos al 5%. Se estableció un control positivo de hemólisis del 100% añadiendo 2 µl de Triton 100X (Promega) a 198 µl de sangre diluida y un control negativo sin hemólisis, añadiendo 2 µl de PBS a 198 µl de sangre diluida. Se incubó durante una hora a 37 °C.

Luego de la incubación, se centrifugó por 5 min a 4000 rpm. Se recogió 100 µl del sobrenadante de cada dilución ensayada en placas de microtitulación de poliestireno

(COSTAR 3590) de 96 pocillos, para medir la hemoglobina liberada mediante un espectrofotómetro (iMark Bio Rad) a 570 nm.

De esta manera se cuantificó el daño celular que puedan causar las moléculas a las concentraciones testadas.

4.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Para detectar la presencia de compuestos potencialmente bioactivos se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las secreciones en un Cromatógrafo Líquido De Alta Eficacia (HPLC) Waters. Para ello se procesaron las muestras en base a Marenah et al. (2004), donde se utilizó 20 mg de cada muestra liofilizada diluida en 2 ml de ácido trifluoacético (TFA) al 0.12% (TFA/H₂O). La solución obtenida se la pasó por filtros de 0,2 µm en viales para HPLC. Se acondicionó la columna semi-preparativa Waters XBridge™ BEH300 C₁₈ con una solución acuosa de TFA al 0.12%, con flujo de 2 ml/min. Se inyectó la muestra de manera automática en un volumen de 1000 µl y se monitoreó la corrida a 214 nm mediante un detector UV/Vis (Waters 2489) durante 74 minutos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESPECÍMENES DE ANFIBIOS ANALIZADOS

Se realizaron dos salidas de campo en las que se recolectaron especímenes de las familias Hylidae, Dendrobatidae y Ranidae. En la primera salida al campo realizada del 20 al 23 de febrero del 2014, a la zona de Quinge y a la zona de Durango, cantón San Lorenzo, se logró recolectar un total de 35 individuos (Tabla 1). En la segunda salida al campo realizada del 27 al 29 de marzo del 2015, a las zonas de Tundaloma y Durango, se recolectó un total de 15 especímenes de anuros (Tabla 2).

Cabe mencionar que las condiciones de traslado de los especímenes del campo al Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la PUCE, resultaron ser idóneas puesto que la tasa de mortalidad fue nula. En relación al mantenimiento de los especímenes en el LICBA, si bien es cierto que se les mantuvo en las mejores condiciones de temperatura y humedad posibles, alrededor del 20% de ellos murió durante las tres primeras semanas posteriores a la fecha de colecta. Esto lleva a deducir que la etapa de aclimatación es crítica o decisiva para su adaptación en cautiverio.

Por tanto, para el análisis de la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas se, utilizaron 10 individuos de *Atelopus* sp. (Bufonidae), 6 de *Gastrotheca* sp. (Hemiphractidae), 7 de *Hypsiboas pellucens* (Hylidae), 13 de *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae), 5 de *Rana* sp. (Ranidae), 24 de *Oophaga sylvatica* (Dendrobatidae), 10 de *Smilisca phaeota* (Hylidae) y 1 de *Trachycephalus jordani* (Hylidae), que se resumen en la Tabla 3.

5.2 EXTRACCIÓN DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS DE ANFIBIOS

Con los especímenes antes mencionados se realizaron un total de 234 extracciones de secreciones cutáneas producidas en las glándulas granulares de la piel de los anfibios (Tabla 7), teniendo la precaución de no repetir la extracción al mismo espécimen durante el lapso de 3 semanas, debido a que es el tiempo que se necesita para que se regeneren las glándulas secretoras (Mangoni, Miele, Renda, Barra y Simmaco, 2001).

Se hace necesario resaltar el hecho de que la cantidad de liofilizado del extracto crudo obtenido, varía notablemente no solo entre especies diferentes, sino entre individuos de la misma especie, lo que obligó a que, de acuerdo a las circunstancias, se realice un mayor número de extracciones en aquellos individuos en los que se obtuvo poco liofilizado, como es el caso de las especies: *Atelopus* sp. (Bufonidae) y *Ophaga sylvatica* (Dendrobatidae) (Tabla 7).

La razón por la cual se obtuvo poca cantidad de liofilizado a partir de éstas especies, podría radicar en el hecho de que la metodología usada en este trabajo estuvo enfocada a la obtención de péptidos antimicrobianos (AMPs) pero, los principales compuestos secretados por anuros de familias como Bufonidae y Dendrobatidae son los alcaloides. Estos compuestos no son sintetizados por los individuos, sino que los capturan de los invertebrados como hormigas, termitas, etc. de los que se alimentan en la naturaleza (König, Bininda-Emonds y Shaw, 2015). Tomando en cuenta que en el LICBA los especímenes son alimentados con grillos, se podría especular que este tipo de dieta también esté influyendo, no solo en la calidad de las secreciones cutáneas, sino también en la cantidad de esta.

Por otro lado, Mangoni et al. (2001) sugiere que la síntesis de AMPs se induce cuando el animal está en un ambiente que promueva el crecimiento de microorganismos que estimulen la actividad de su sistema inmune; tal es el caso del ambiente en el que naturalmente crecen los anfibios, mientras que en el laboratorio se les mantiene en condiciones de asepsia. De igual manera se ha registrado que el nivel de AMPs en secreciones cutáneas está relacionado con las condiciones de temperatura ambiental que pueden afectar el crecimiento de microorganismos (Matutte, Storey, Knoop y Conlon, 2000). Dos factores claves que podrían también incidir en la cantidad y calidad de las secreciones cutáneas obtenidas.

Las secreciones cutáneas de *Gastrotheca* sp. y *Trachycephalus jordani* mostraron ser viscosas y adhesivas, patrón característico en especies donde el valor defensivo de la secreción parece ser mecánico, en lugar de químico, antimicrobiano o citotóxico (König et al., 2013).

5.3 PRUEBAS DE DIFUSIÓN POR DISCO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE ANUROS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC

Para comprobar la actividad antimicrobiana de las secreciones cutáneas totales extraídas de un total de 76 individuos de 8 distintas especies anfibios, se realizaron pruebas de difusión por disco (Figuras 3 y 4).

Debido a la obtención de poca cantidad de secreción en algunas especies de anuros estudiados, se optó por reunir el liofilizado de distintos individuos de la misma especie y realizar las distintas soluciones. Sin embargo, al obtener resultados negativos en todos los ensayos, se vio la necesidad de realizar las pruebas individualmente. Al respecto König, et al. (2013) reportan que hay indicios cada vez mayores sobre la variación intra-individual de los productos de secreción entre los diferentes tipos de glándulas granulares lo que pone de manifiesto aún más la notable plasticidad y valor adaptativo del sistema de órganos cutáneos en anfibios.

Se encontró que la secreción de *Hypsiboas rosenbergi* SC26960 fue capaz de inhibir el crecimiento de *Serratia marcescens* ATCC 13880 a 4000 µg/ml pues, como se puede observar en la Figura 3A y Tabla 8, formó halos de inhibición de 8 mm. De igual manera, controló el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 formando halos de inhibición de 9 mm a concentraciones de 4000 y 2000 µg/ml (Figura 4A, Tabla 8).

Otra de las especies de ranas cuya secreción cutánea total presentó actividad antibacteriana fue *Rana* sp. SC27141 pues logró formar halos de inhibición de 9 mm para *Serratia marcescens* ATCC 13880 a la concentración de 4000 µg/ml (Figura 3B, Tabla 8), y halos entre 12 a 10 mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a concentraciones de 4000, 2000 y 1000 µg/ml (Figura 4B, Tabla 8).

Estas dos especies que presentaron actividad antimicrobiana son representantes de las familias Hylidae y Ranidae. En la literatura se reporta que, precisamente, estas dos familias son en las que se ha detectado el mayor número de AMPs de anfibios con actividad, no solo antimicrobiana, sino incluso antiviral, antifúngica y antitumoral (Mangoni et al., 2001).

Con respecto a las secreciones cutáneas de anfibios de las restantes especies analizadas no se obtuvieron halos de inhibición sobre ninguna de las bacterias ATCC, que indiquen algún grado de actividad antimicrobiana (Tabla 8), razón por la cual no se pudo llevar a cabo ningún análisis estadístico.

Los resultados negativos en la detección de actividad antibacteriana de las secreciones cutáneas obtenidos en las pruebas de difusión por disco, no significan necesariamente la ausencia de compuestos defensivos de esas especies. De hecho, se ha visto que en ausencia de factores a los que se ven expuestos los anfibios en la naturaleza, la síntesis de péptidos recae en gran medida y su actividad antimicrobiana se ve reducida hasta en una quinta parte (Mangoni et al., 2001).

Se hace necesario mencionar que los especímenes cuyas secreciones no formaron halos de inhibición en este estudio, fueron mantenidos en cautiverio (fuera de su ambiente natural) por más de un año; por lo tanto, si se toma en cuenta lo propuesto por Mangoni et al. (2001), la ausencia de actividad antimicrobiana se debería a una baja concentración de moléculas bioactivas, presentes en ellas. Esto generaría la necesidad de implementar una técnica que permita detectar AMPs presentes en las secreciones cutáneas totales a concentraciones bajas, tal es el caso de la técnica de microdilución en caldo que se analiza en la siguiente sección.

Las ranas pertenecientes a diferentes especies o incluso subespecies producen distintos AMPs (entre 6 y 20) con un tamaño, carga, hidrofobicidad, conformación y espectro de acción distintos; esta diversidad entre AMPs estrechamente relacionados es consistente con la hipótesis de que han sido sometidos a una selección positiva (Tossi, Sandri y Giangaspero, 2000).

A pesar de las similitudes de secuencia, los miembros de una familia de péptidos en particular tienen un espectro distinto de la actividad antimicrobiana y se ha especulado que esta diversidad molecular es importante para proteger al animal de la invasión por una amplia gama de distintos microorganismos (Duda, Vanhoye y Nicolas, 2002).

Se ha reportado que un número considerable de especies de anfibios parecerían carecer totalmente de AMPs. Tal es el caso de la familia Hemiphractidae (Anexo 6) a la

que pertenece una de las especies estudiadas en esta investigación (*Gastrotheca* sp.). Según el análisis realizado por König et al., (2015), si los AMPs funcionan exclusivamente como parte del sistema inmune innato contra patógenos microbianos, esta deficiencia reduciría la aptitud de estas especies. Sin embargo, miembros de este género están bien representados en nuestro país (Ron et al., 2016); esto implicaría que su sobrevivencia frente a los patógenos del medio ambiente en los que se desenvuelven, podría deberse a que su inmunidad innata estaría relacionada a otros factores como son: la presencia en su piel de flora bacteriana que controlan patógenos, presencia de otro tipo de moléculas diferentes a los AMPs como aminos biogénicos, esteroides, etc.

Llama la atención el hecho de que especies dentro del mismo género, unas presenten secreciones con actividad antimicrobiana y otras no. Por ejemplo, en este estudio se constató que la secreción cutánea total de *Hypsiboas rosenbergi* controla el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, mientras que *Hypsiboas pellucens* no lo hace. Además, Cilveti et al. (2013) reportaron que *Atelopus elegans* inhibe el crecimiento de aislados clínicos multirresistentes de *Serratia marcescens*, mientras que los individuos de *Atelopus* sp., analizados en este trabajo, no presentaron actividad antimicrobiana. En definitiva, hay un número elevado de especies de anfibios en las cuales la ausencia de AMPs no puede ser fácilmente explicada y se presume que la expresión de los genes que los codifican puede verse afectada por factores extrínsecos como exposición a los patógenos, temperatura ambiental, etc. (König et al., 2015).

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo (Wiegand et al., 2008). Estos valores de MIC se determinan a partir de pruebas de microdilución en caldo.

Para este ensayo se utilizaron las secreciones cutáneas totales de anfibios que mostraron efecto inhibitorio en las pruebas de difusión por disco, las cuales fueron *Hypsiboas rosenbergi* SC26960 y *Rana* sp. SC27141, sobre un total de 18 aislados clínicos resistentes de *Serratia marcescens* (Tabla 5) y de *Staphylococcus aureus* (Tabla 6).

Durante el transcurso de esta investigación el individuo de *Hypsiboas rosenbergi* SC26960 murió, por lo que no se pudo realizar las pruebas suficientes con la secreción cutánea total proveniente de esta especie.

En los resultados presentados en la Figura 5 y Tabla 9, se observa un efecto inhibitorio casi nulo de la secreción cutánea de *Rana* sp. sobre los 18 aislados clínicos multirresistentes de *Serratia marcescens* a 4000 µg/ml a pesar de que ésta fue la mayor concentración probada. Este resultado es consistente con lo reportado por Zasloff (2002) donde se observó que bacterias del género *Serratia* muestran en su membrana externa una carencia de lípidos ácidos, que dificultan a los AMPs adherirse a su sitio de unión, sugiriendo que éste es el posible método de defensa del microorganismo, a la acción de las moléculas peptídicas.

A diferencia de lo observado con *Serratia marcescens*, el efecto inhibitorio de la secreción cutánea de *Rana* sp. resultó sumamente eficaz sobre los 12 aislados clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, pues con todas las concentraciones probadas (desde 4000 a 7.82 µg/ml), hubo efecto inhibitorio (Figura 6, Tablas 10 - 12).

Cabe mencionar que estos datos son consistentes con estudios previos reportados en la bibliografía en los que se comprobó una potente actividad de AMPs, aislados a partir de otras especies del género *Rana*, sobre *Staphylococcus aureus* (Conlon et al., 2003; Conlon et al., 2009).

En definitiva, tal como se constata en la Figura 5 y Tablas 10 - 12, la Concentración Mínima Inhibitoria de la secreción cutánea total de *Rana* sp. es de 7.82 µg/ml.

Como se pudo ver mediante la prueba de difusión en disco, la secreción de *Rana* sp. formó un halo de inhibición solo a las concentraciones de 4000 y 2000 y 1000 µg/ml. Sin embargo, la prueba de microdilución en caldo permitió detectar el control bacteriano de la secreción cutánea a concentraciones tan bajas como la de 7,88 µg/ml. Esto nos permite afirmar que la técnica de microdilución en caldo es mucho más sensible que la de difusión por disco.

5.5 EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

Tomando en cuenta que el objetivo es buscar moléculas que puedan ser una alternativa en el tratamiento de infecciones bacterianas reduciendo la posibilidad de generar resistencia, se hace necesario realizar pruebas que detecten el efecto de éstas, sobre los glóbulos rojos humanos.

Por consiguiente, en este trabajo se evaluó el grado de hemólisis de la secreción cutánea total de *Rana* sp. en dos muestras de donantes hombre y mujer de 28 y 26 años respectivamente (Figura 7), para obtener la concentración letal que provoca el 50% de daño celular (LC₅₀) como una medida de toxicidad de la secreción (Henkelman, Rakhorst, Blanton y Van Oeveren, 2009).

En base a los resultados que se resumen en la Figura 8 y Tabla 13 se pudo determinar que la concentración letal que causa lisis celular a más del 50% de eritrocitos es igual a 500 µg/ml (LC₅₀ = 500 µg/ml). La acción hemolítica observada, fue similar tanto en la muestra de hombre como de mujer.

Es necesario recalcar que a la concentración de 7.8 µg/ml, que resultó ser el MIC para la secreción de *Rana* sp., el porcentaje de hemólisis es de apenas el 2.85%

Estos resultados ratifican que la secreción proveniente de la piel de *Rana* sp. es altamente prometedora como una futura alternativa terapéutica para tratar afecciones con patógenos muy agresivos.

Resulta interesante mencionar que estudios *in vitro* con péptidos provenientes de ranas de este género, han mostrado que además de la actividad antimicrobiana, éstos presentan también actividad citotóxica sobre células tumorales. Por ejemplo, el péptido ranatuerin-2, resultó altamente eficaz en el control de una amplia gama de tipos de células de cáncer hepático, sugiriendo que puede tener potencial para el desarrollo en un agente anticancerígeno (Conlon et al., 2009).

5.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

En el cromatógrafo líquido de alta eficacia, HPLC, se realizaron siete corridas de la secreción cutánea total obtenida a partir de la piel de individuos de *Gastrotheca* sp. (Hemipractidae), *Hypsiboas pellucens* (Hylidae), *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae), *Oophaga sylvatica* (A y R) (Dendrobatidae), *Rana* sp. (Ranidae) y *Smilisca phaeota* (Hylidae) y se obtuvieron los respectivos perfiles cromatográficos (Figuras 9 - 15). Todas las corridas en el HPLC presentaron un patrón cromatográfico estándar para cada una de las especies analizadas.

El cromatograma correspondiente a *Hypsiboas rosenbergi* (Figura 11) muestra alta concentración peptídica entre el minuto 19 al 25, y el minuto 38 al 45, pues en estos minutos de retención presenta picos con mayor valor de absorbancia en unidades (Au). También se puede observar que los picos que conforman estos periodos de tiempo presentan pesos moleculares cercanos entre sí. Este cromatograma también muestra presencia de moléculas peptídicas desde los 6 a los 68 minutos de corrida, pero a concentraciones relativamente bajas, pues no alcanza valores superiores a 0.2 Au de absorbancia.

El cromatograma correspondiente a *Rana* sp. (Figura 12) muestra presencia proteica en concentraciones bajas no mayores a 0.6 Au de absorbancia, con excepción de los picos correspondientes a los tiempos de retención 21.8; 50.3; 59.7 y 62.5 cuyos valores oscilan entre 1.1 Au y 1.6 Au. En el periodo en tiempo de retención entre 33 y 46 minutos se observa una fuerte presencia de moléculas peptídicas con pesos moleculares cercanos entre sí, razón por la cual no se puede obtener línea base en este periodo.

La secreción cutánea total de *Rana* sp. es una muestra prometedora porque ha demostrado en este estudio, tener una potente actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. Esto hace necesario que se proceda a realizar la purificación y caracterización de las moléculas responsables de este tipo de actividad. Para ello se requiere recuperar cada una de las fracciones separadas en el HPLC para realizar pruebas antimicrobianas con cada una de ellas y así poder dilucidar posteriormente, mediante técnicas moleculares y/o analíticas, la estructura de aquellas fracciones que mantienen su efecto inhibitorio.

6. CONCLUSIONES

1. De las ocho especies de anfibios analizados, solo las secreciones cutáneas totales de *Hypsiboas rosenbergi* (Hylidae) y *Rana* sp. (Ranidae) presentaron actividad antimicrobiana en las pruebas de difusión por disco a concentraciones de 4000 y 2000 µg/ml sobre cepas bacterianas ATCC de *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*.
2. La secreción cutánea más eficiente resultó ser de *Rana* sp., pues presentó inhibición bacteriana sobre aislados clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* con un MIC de 7,82 µg/ml.
3. Concentraciones menores a 4000 µg/ml de la secreción de *Rana* sp. resultan ineficientes para inhibir el crecimiento bacteriano de aislados clínicos de *Serratia marcescens*.
4. El ensayo de microdilución en caldo, muestra mayor sensibilidad en comparación con la técnica de difusión en disco, ratificando su uso como método de referencia para pruebas de sensibilidad “*in vitro*”.
5. La secreción cutánea de *Rana* sp. presenta un grado de hemólisis del 2.85% para la concentración más baja ensayada (7.82 µg/ml).
6. El análisis del cromatograma de *Rana* sp. muestra moléculas con alta concentración en los minutos 50.3; 59.7 y 62.5.
7. En definitiva, estos resultados comprueban el efecto antimicrobiano de las secreciones cutáneas de anuros ecuatorianos, con compuestos bioactivos que podrían ser usados como fuente alternativa a los antibióticos convencionales.

7. RECOMENDACIONES

1. Tomando en cuenta que factores como la humedad, temperatura y modo de alimentación, afectan la producción de compuestos antimicrobianos en las glándulas granulares de los anfibios, se deberían realizar extracciones cutáneas totales en el sitio de colecta y comparar sus propiedades antimicrobianas con extractos realizados en el laboratorio.
2. Se debe buscar el mecanismo que permita descifrar la inmunidad innata de los dendrobátidos, empezando por analizar si los alcaloides poseen o no actividad contra patógenos o estudiando la flora bacteriana asociada a su piel, la misma que podría estar involucrada en el control de microorganismos potencialmente patógenos para el anfibio.
3. Debido a la alta sensibilidad de la prueba de microdilución en caldo para la detección de la actividad antimicrobiana, se debería aplicar esta técnica a todas las secreciones cutáneas de anfibios que mediante la prueba de difusión por disco dieron negativas, haciéndose énfasis en la de *Hypsiboas rosenbergi*.
4. En base a la potente actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *Rana* sp. resulta importante recuperar cada una de las fracciones separadas en el HPLC para realizar ensayos antimicrobianos con cada una de ellas y encontrar el o los compuestos responsables de dicha actividad.

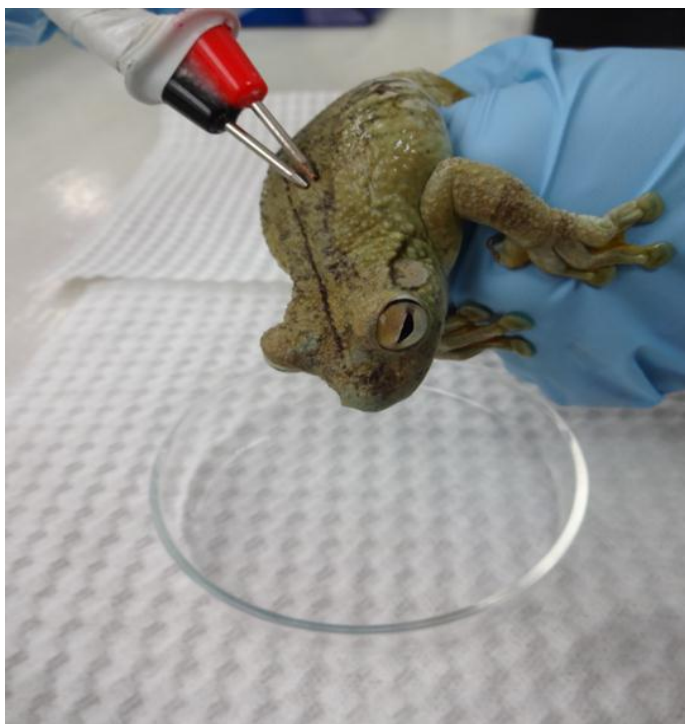
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asoodeh, A., Sepahi, S. y Ghorani - Azam, A. (2014). Purification and modeling amphipathic alpha helical antimicrobial peptides from skin secretions of *Euphlyctis cyanophlyctis*. *Chemical biology & drug design*, 83(4), 411-417.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Caicedo, A. (2007). *Análisis de secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas*. (Disertación de Pregrado), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Cilveti, C., Rivera, M., Rodríguez-Riglos, M. y Alcocer, I. (2013). Inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, XXXIV, 85-98.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eleventh Edition*. CLSI document. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Conlon, J. M., Sonnevend, A., Patel, M., Davidson, C., Nielsen, P. F., Pal, T. y Rollins - Smith, L. A. (2003). Isolation of peptides of the brevinin 1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylii*. *The Journal of peptide research*, 62(5), 207-213.
- Conlon, J. M. (2004). The therapeutic potential of antimicrobial peptides from frog skin. *Reviews in Medical Microbiology*, 15(1), 17-25.
- Conlon, J. M., Raza, H., Coquet, L., Jouenne, T., Leprince, J., Vaudry, H. y King, J. D. (2009). Purification of peptides with differential cytolytic activities from the skin secretions of the Central American frog, *Lithobates vaillanti* (Ranidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(2), 150-154.
- Conlon, J. M. (2011). Structural diversity and species distribution of host defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2303-2315.
- Conlon, J. M. y Mechkarska, M. (2014). Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. *Pharmaceuticals*, 7(1), 58-77.
- Duda, T. F., Vanhoye, D. y Nicolas, P. (2002). Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Molecular biology and evolution*, 19(6), 858-864.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Barchiesi, F. y Scalise, G. (2000). In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and

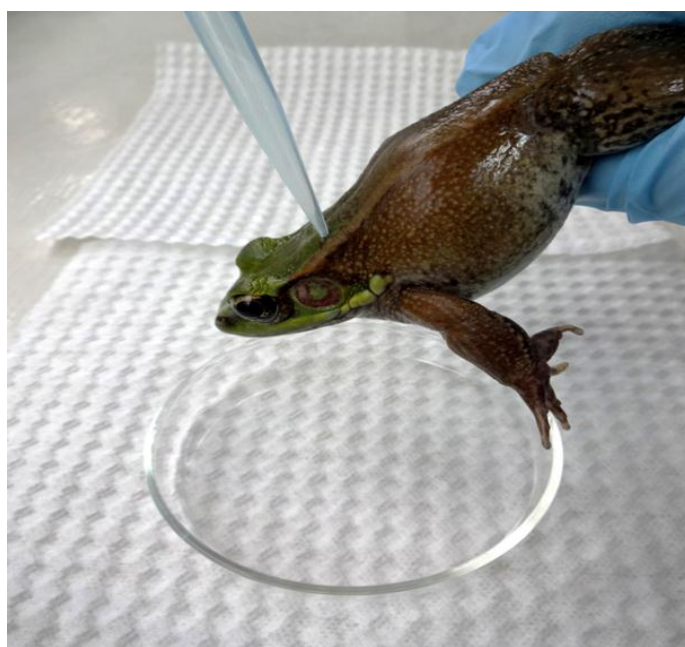
- interactions with clinically used antibiotics. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 38(2), 115-118.
- Grant, T. y Land, B. (2002). Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): A device for the collection of amphibian skin secretions. *Herpetological Review*, 33, 38-41.
- Henkelman, S., Rakhorst, G., Blanton, J. y van Oeveren, W. (2009). Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. *Materials Science and Engineering*, 29(5), 1650-1654.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.
- König, E., Wesse, C., Murphy, A. C., Zhou, M., Wang, L., Chen, T. ...y Bininda-Emonds, O. R. (2013). Molecular cloning of the trypsin inhibitor from the skin secretion of the Madagascan Tomato Frog, *Dyscophus guineti* (Microhylidae), and insights into its potential defensive role. *Organisms Diversity & Evolution*, 13(3), 453-461.
- König, E., Bininda-Emonds, O. R. y Shaw, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63, 96-117.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., & Krishnan, P. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 10(9), 597-602.
- Mangoni, M. L., Miele, R., Renda, T. G., Barra, D. y Simmaco, M. (2001). The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *The FASEB Journal*, 15(8), 1431-1432.
- Marenah, L., Shaw, C., Orr, D. F., McClean, S., Flatt, P. R., & Abdel-Wahab, Y. H. A. (2004). Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas*. *Regulatory peptides*, 120(1), 33-38.
- Matutte, B., Storey, K. B., Knoop, F. C. y Conlon, J. M. (2000). Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze tolerant frog, *Rana sylvatica*, in response to environmental stimuli. *FEBS letters*, 483(2-3), 135-138.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing in Publication Data. Recuperado de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/112647>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO Library Cataloguing in Publication Data. Recuperado de <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
- Perron, G. G., Zasloff, M. y Bell, G. (2006). Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273(1583), 251-256.

- Powers, J. P. S. y Hancock, R. E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681-1691.
- Proaño-Bolaños, C., Zhou, M., Wang, L., Coloma, L. A., Chen, T. y Shaw, C. (2016). Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Journal of Proteomics*, 146, 1-13.
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. (2016). AmphibiaWebEcuador. Version 2016.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/>
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236-248.
- Tossi, A., Sandri, L. y Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 55(1), 4-30.
- Vanhoye, D., Bruston, F., Nicolas, P. y Amiche, M. (2003). Antimicrobial peptides from hyloid and ranin frogs originated from a 150 million year old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*, 270(9), 2068-2081.
- Vargas, A., Pérez, O., Ortega, D. y Rivera, M. (2015). Caracterización molecular de péptidos antimicrobianos a partir de muestras de piel de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, XXXVI (2), 57-65.
- Wang, G., Li, X. y Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44, D1087-D1093.
- Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and Broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3 (2): 163-175.
- Yeaman, M. R. y Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
- Zaslloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395.
- Zurita, J. (2012). *Resistencia Bacteriana en el Ecuador*. Centro de Publicaciones PUCE, Quito, Ecuador.

9. FIGURAS



A



B

Figura 1. Obtención de secreciones cutáneas de anfibios. A: *Hypsiboas rosenbergi*, B: *Rana* sp. Mediante estimulación eléctrica utilizando el Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS)

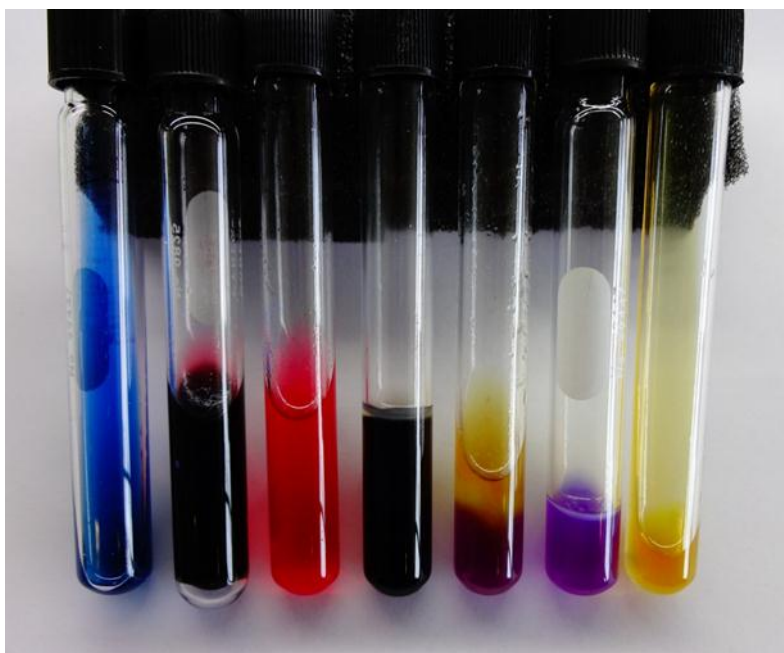
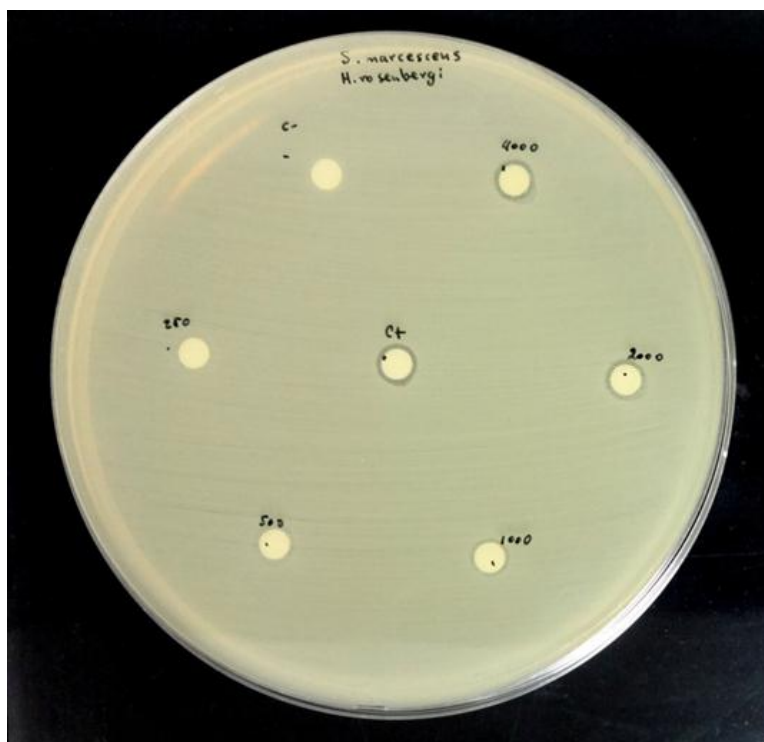


Figura 2. Validación de *Salmonella* Enteritidis mediante pruebas bioquímicas.
Izquierda a derecha: Citrato, TSI, MR/VP, SIM, MILI, MIO, Fenil Alanina

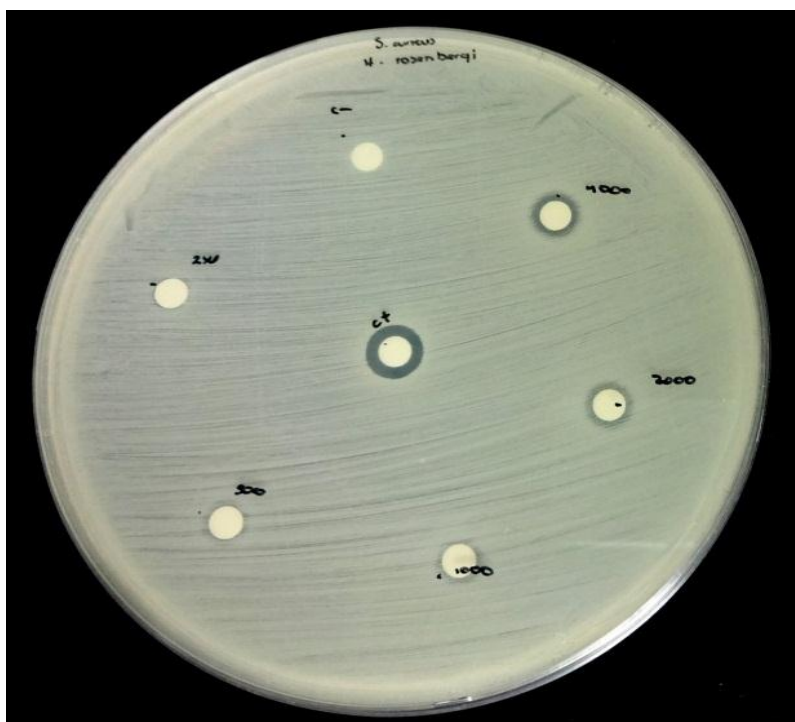


A



B

Figura 3. Prueba de difusión por disco de *Serratia marcescens* ATCC 13880. Secreción cutánea de A: *Hypsiboas rosenbergi*, B: *Rana* sp., a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$.



A



B

Figura 4. Prueba de difusión por disco de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Secreción cutánea de A: *Hipsiboas rosenbergi*, B: *Rana* sp., a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$.



Figura 5. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de *Rana* sp. sobre aislados clínicos multirresistentes de *Serratia marcescens*

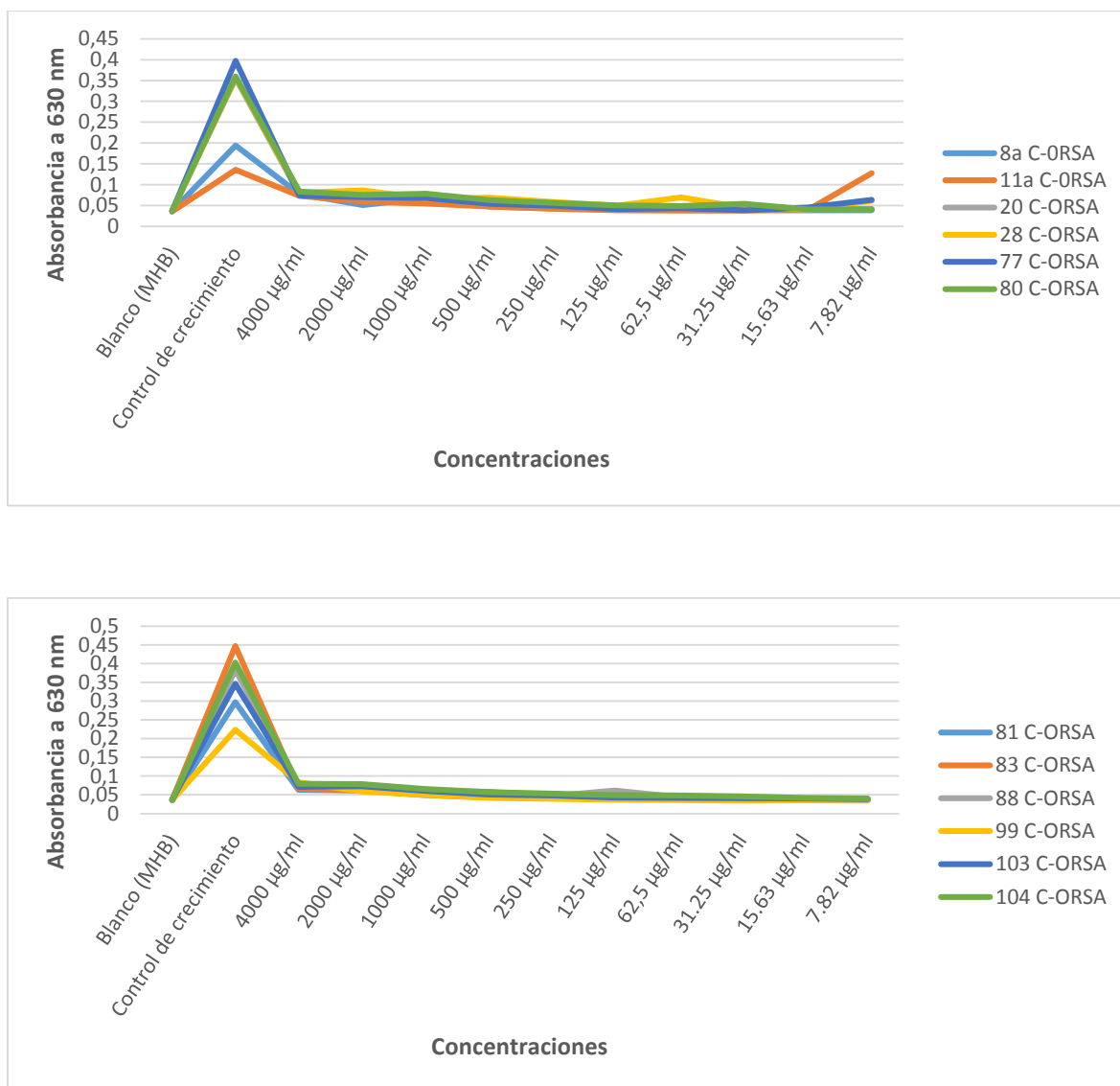


Figura 6. Efecto inhibitorio de la secreción cutánea total de *Rana* sp. sobre aislados clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus*

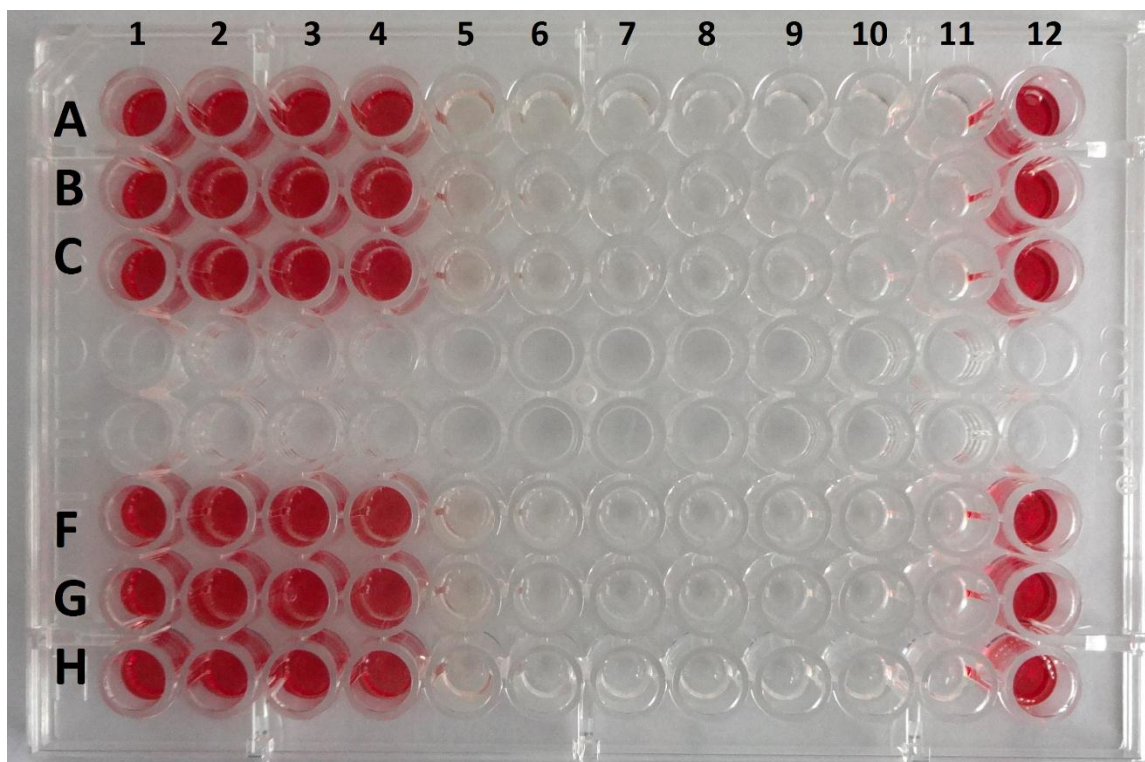


Figura 7. Efecto hemolítico de la secreción cutánea de *Rana* sp. Se observa la placa de microtitulación con tres repeticiones para dos individuos: Hombre (A-C), Mujer (F-H). Columna 1 – 10 concentraciones: 4000 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 15.63 $\mu\text{g/ml}$ y 7.82 $\mu\text{g/ml}$. Control no hemolítico (columna 11), control de hemólisis (columna 12)

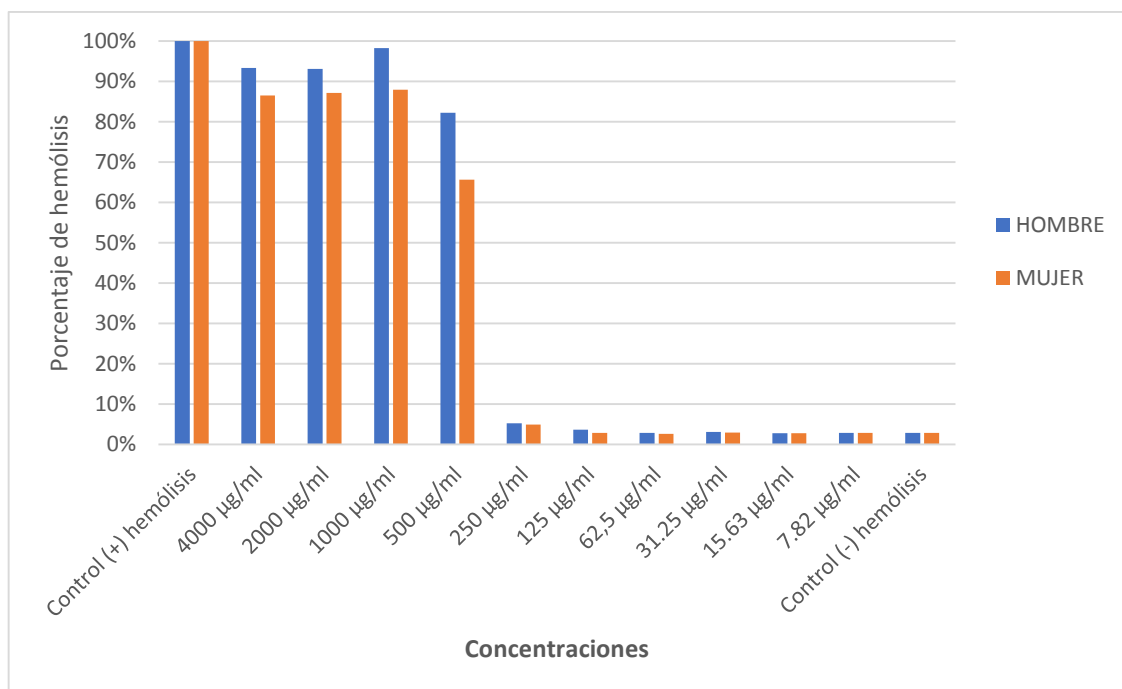


Figura 8. Porcentaje de hemólisis de la secreción de *Rana* sp., en muestras sanguíneas de hombre y mujer

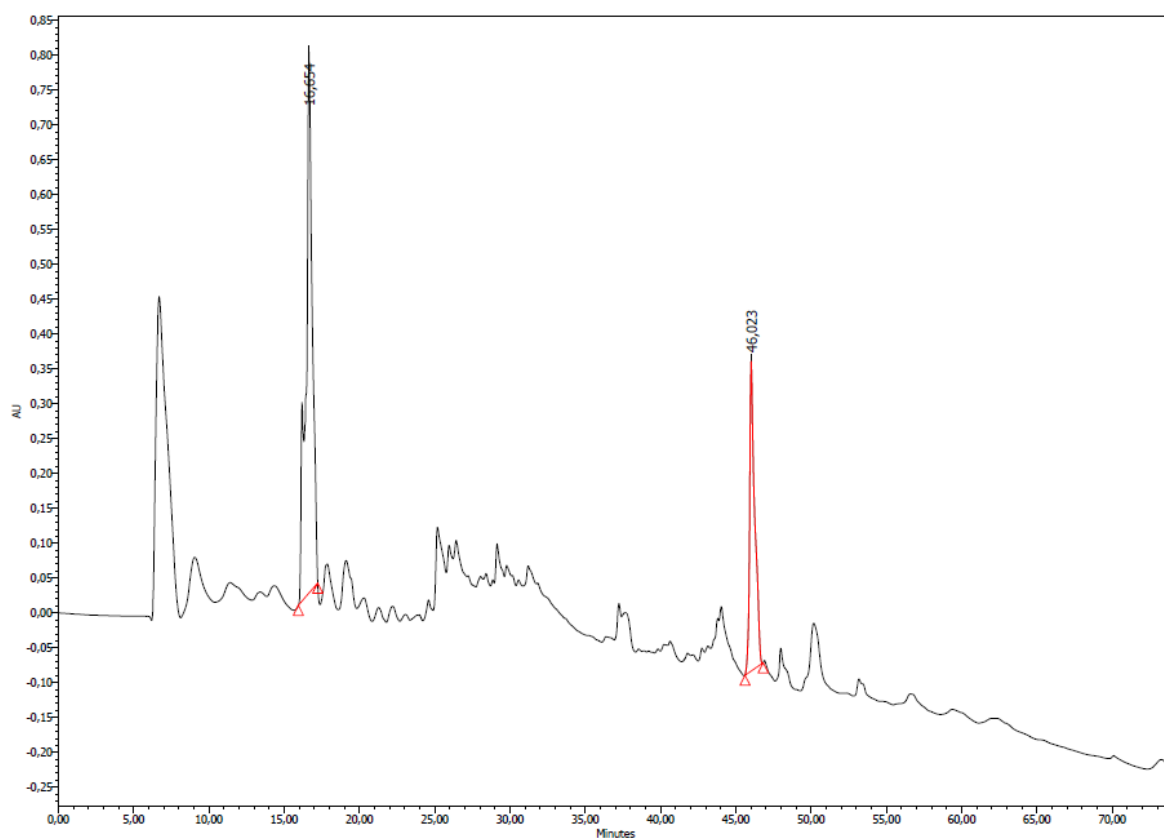


Figura 9. Perfil cromatográfico de *Gastrotheca* sp.

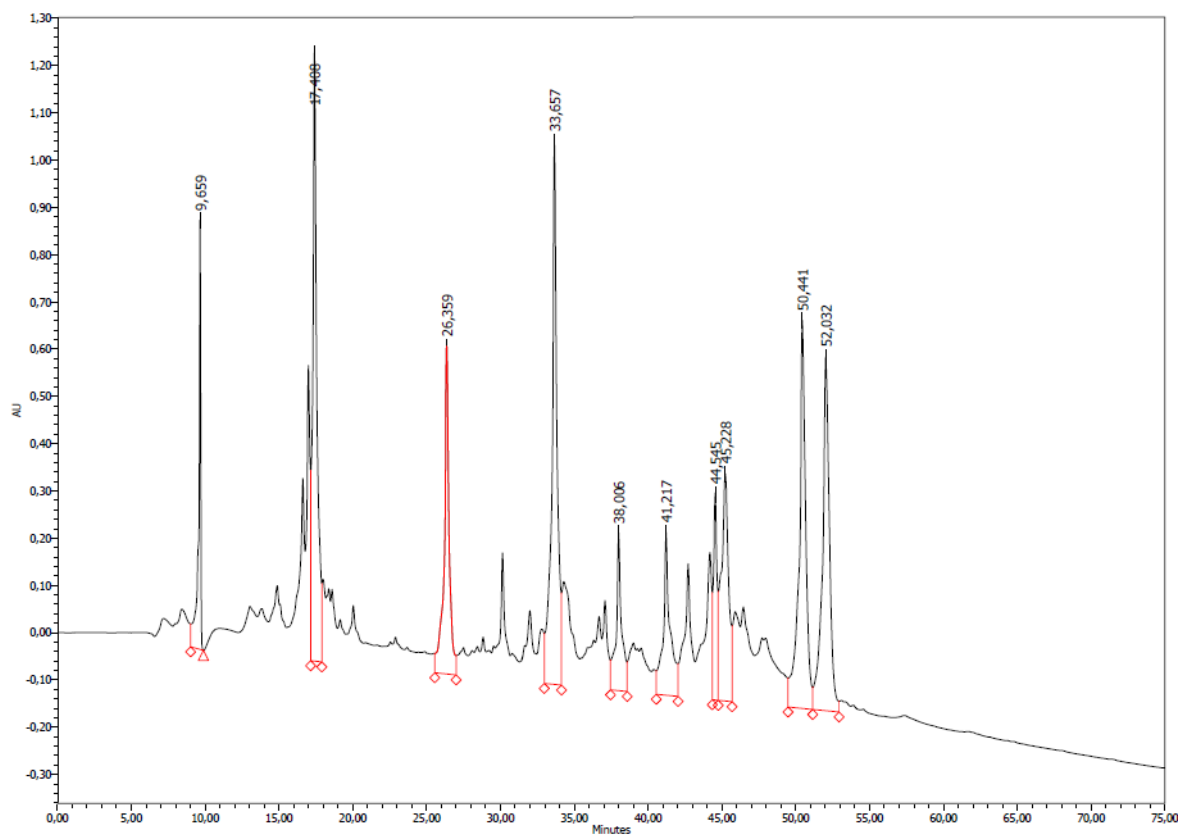


Figura 10. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas pellucens*

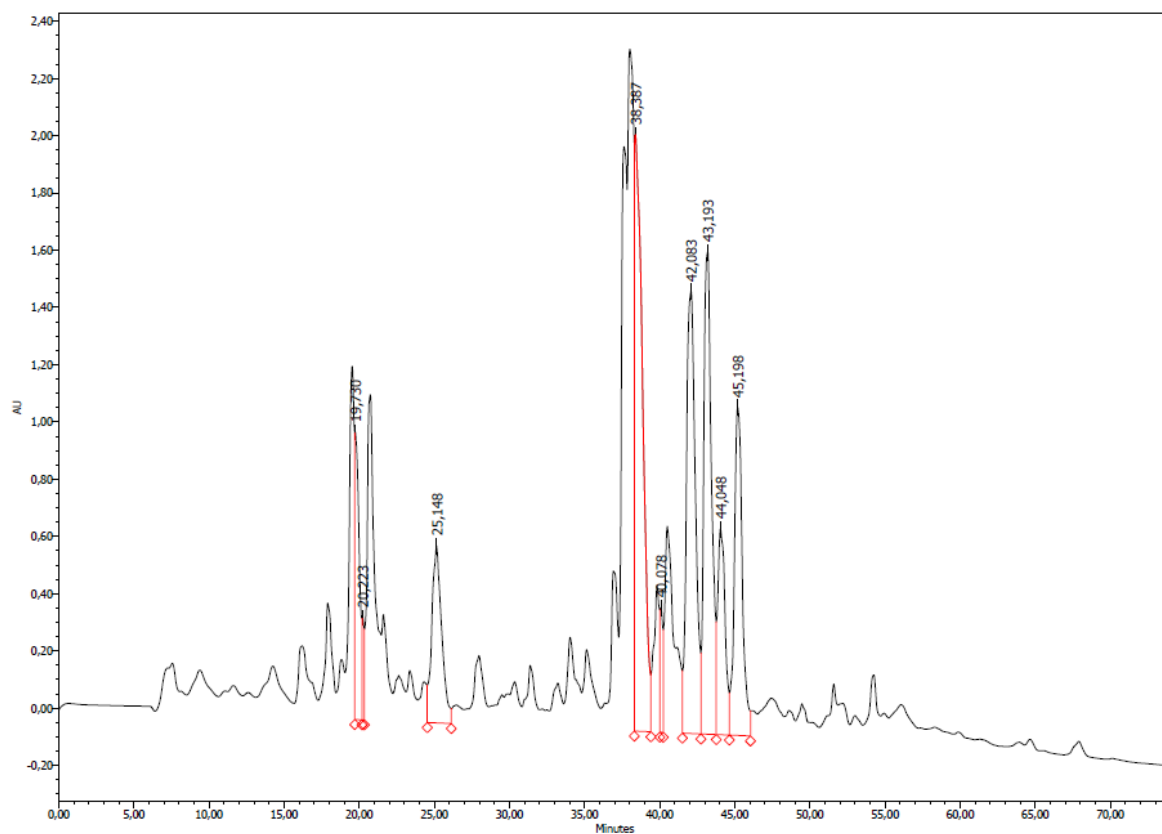


Figura 11. Perfil cromatográfico de *Hypsiboas rosenbergi*

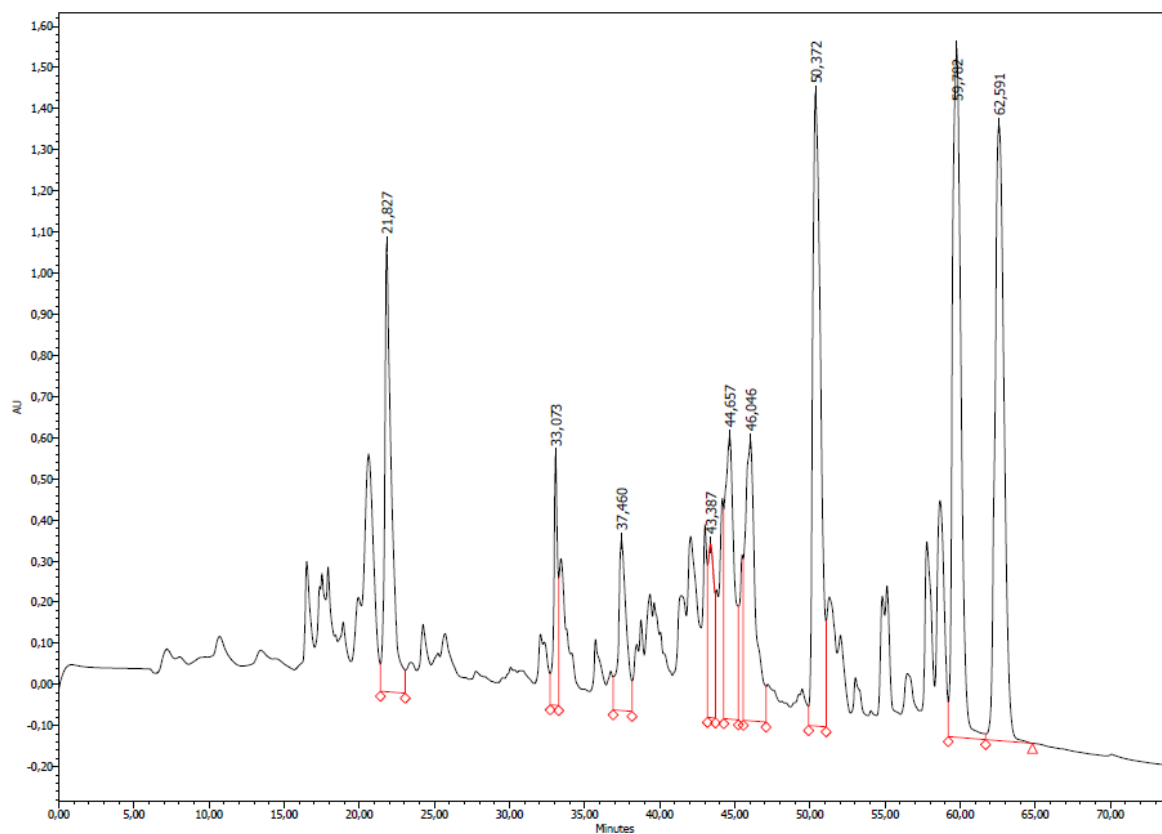


Figura 12. Perfil cromatográfico de *Rana sp.*

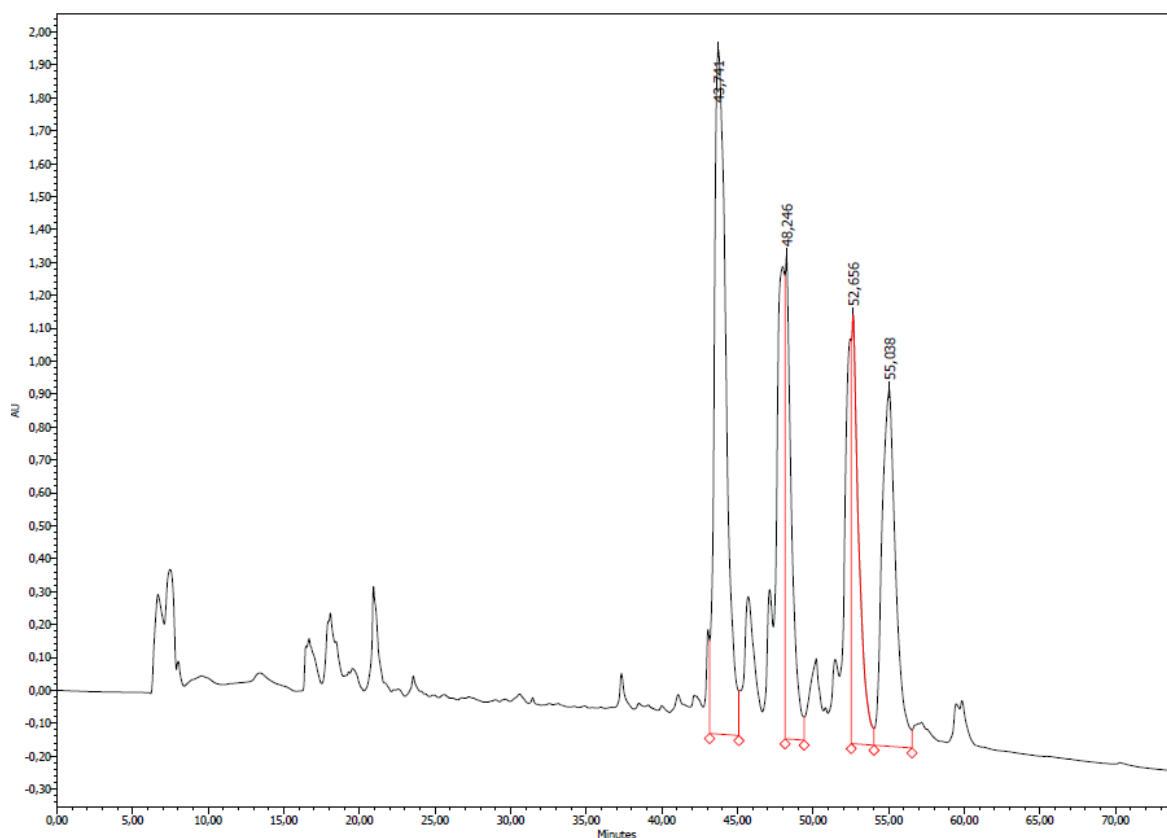


Figura 13. Perfil cromatográfico de *Oophaga sylvatica* (morfortipo anaranjado)

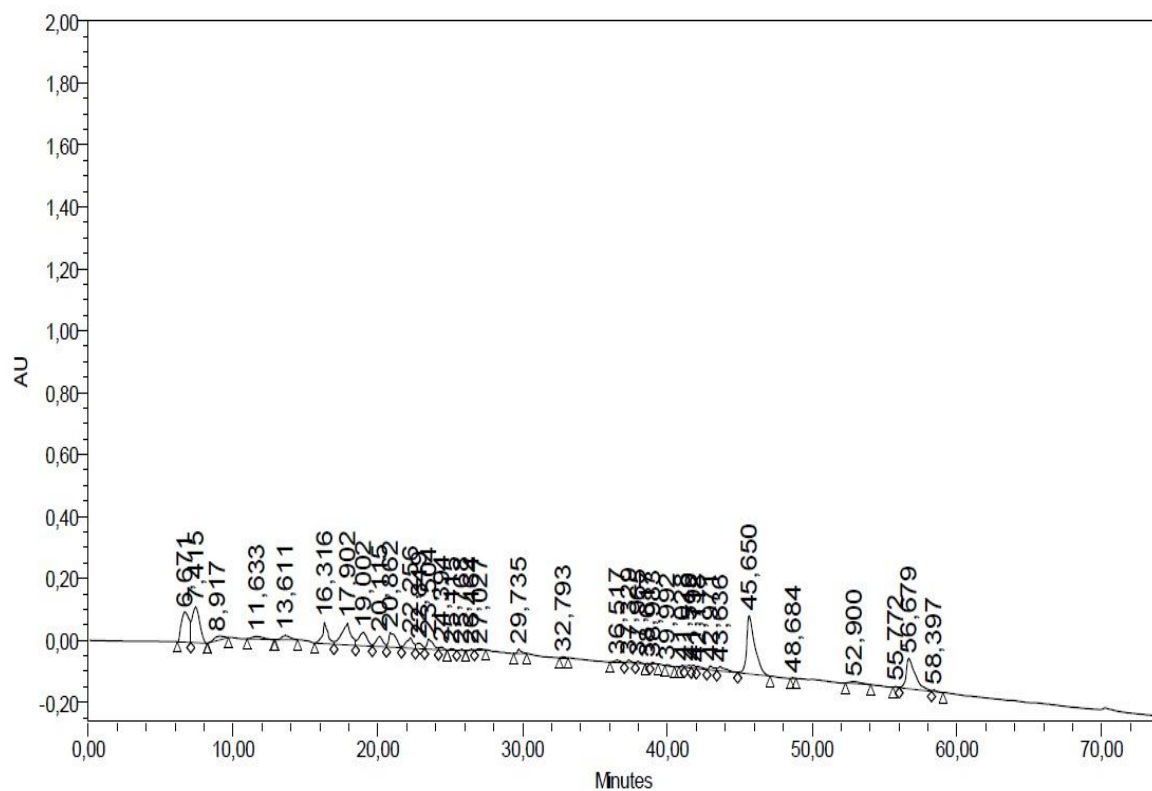


Figura 14. Perfil cromatográfico de *Oophaga sylvatica* (morfortipo rojo)

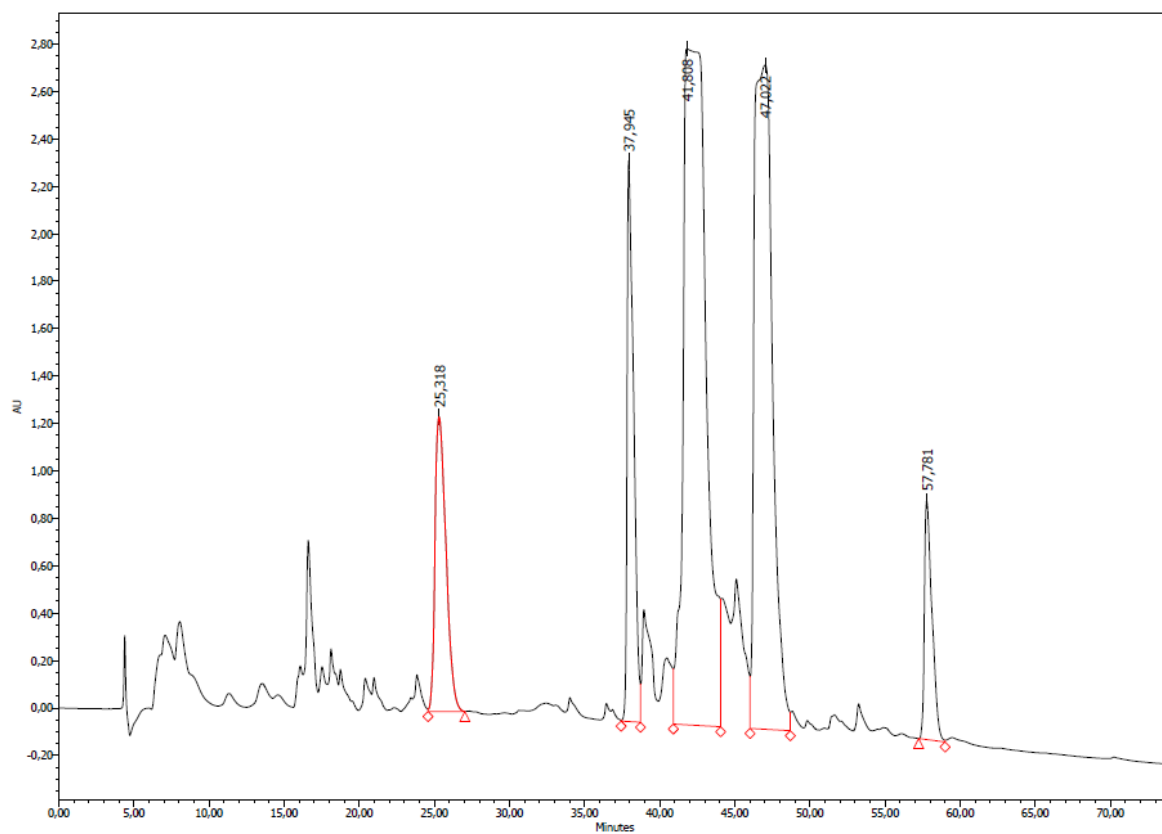


Figura 15. Perfil cromatográfico de *Smilisca phaeota*

10. TABLAS

Tabla 1. Lista de individuos colectados en la salida al campo de 2014

Fecha	Localidad	Coordenadas	Especies colectadas	Serie de campo
21-feb-2014	Esmeraldas, cantón Muisne, parroquia Quinge, Vía a la antena de Movistar	00 ⁰ 42' 51" N/ 80 ⁰ 04' 32" W	<i>Oophaga sylvatica</i> (color rojo)	27136
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color rojo)	27137
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color rojo)	27138
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color rojo)	27139
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color rojo)	27140
22-feb-2014	Esmeraldas, cantón San Lorenzo Durango	01 ⁰ 02' 31" N/ 78 ⁰ 37' 26" W	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26960
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27142
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27144
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27152
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27153
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27154
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27155
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27156
			<i>Lithobates</i> sp.,	27157
			<i>Lithobates</i> sp.,	27141
			<i>Lithobates</i> sp.,	27143
			<i>Smilisca phaeota</i>	26961
			<i>Smilisca phaeota</i>	26962

Tabla 1. Lista de individuos colectados en la salida al campo de 2014 (Continuación)

Fecha	Localidad	Coordenadas	Especies colectadas	Serie de campo
23-feb-2014	Esmeraldas, cantón San Lorenzo Durango	1 ⁰ 1' 56" N/ 78 ⁰ 37' 49" W	<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26941
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26942
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26944
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26945
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26946
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26947
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26948
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26949
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26950
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26951
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26952
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26953
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26954
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26955
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26956
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26957
			<i>Oophaga sylvatica</i> (color anaranjado)	26958

Tabla 2. Lista de individuos colectados en la salida al campo de 2015

Fecha	Localidad	Coordenadas	Especies colectadas	Serie de campo
27-mar-2015	Esmeraldas, cantón San Lorenzo, Tundaloma	1° 10' 53.725" N / 78° 45' 4.71" W	<i>Hypsiboas</i> sp.	26686
			<i>Hypsiboas</i> sp.	26687
			<i>Pristimantis achatinus</i>	26689
			<i>Hypsiboas pellucens</i>	26692
			<i>Scinax quinquiefasciatus</i>	26693
			<i>Smilisca phaeota</i>	26694
			<i>Scinax quinquiefasciatus</i>	26695
			<i>Scinax quinquiefasciatus</i>	26696
			<i>Hypsiboas pellucens</i>	26697
			<i>Oophaga sylvatica</i>	26698
			<i>Oophaga sylvatica</i>	26699
			<i>Hyloxalus</i> sp.	26701
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26702
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26703
28-mar-2015	Esmeraldas, cantón San Lorenzo Tundaloma y Durango	1° 10' 53.725" N / 78° 45' 4.71" W	<i>Hypsiboas pellucens</i>	26704
			<i>Hypsiboas pellucens</i>	26705
			<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26706
			<i>Lithobates</i> sp.	26707
			<i>Lithobates</i> sp.	26708
			<i>Oophaga sylvatica</i>	26711

Tabla 3. Especies de anfibios de los que se obtuvo secreciones cutáneas

Familia	Especie	Serie de campo	Número QCAZ
Bufonidae	<i>Atelopus</i> sp.	26597	5923
	<i>Atelopus</i> sp.	26598	65924
	<i>Atelopus</i> sp.	26599	65925
	<i>Atelopus</i> sp.	26600	65926
	<i>Atelopus</i> sp.	26601	65927
	<i>Atelopus</i> sp.	26602	-
	<i>Atelopus</i> sp.	26603	65928
	<i>Atelopus</i> sp.	26604	65929
	<i>Atelopus</i> sp.	26605	57051
	<i>Atelopus</i> sp.	26606	65930
Dendrobatidae	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26699	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26711	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26941	65905
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26942	65906
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26944	65907
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26945	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26946	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26947	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26948	65908
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26949	65909
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26950	65910
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26951	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26952	65911
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26953	65912
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26954	-
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26955	65913
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26956	65914
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26957	65915
	<i>Oophaga sylvatica</i> (A)	26958	65916
	<i>Oophaga sylvatica</i> (R)	27136	65896
	<i>Oophaga sylvatica</i> (R)	27137	65897
	<i>Oophaga sylvatica</i> (R)	27138	65898
	<i>Oophaga sylvatica</i> (R)	27139	65899
	<i>Oophaga sylvatica</i> (R)	27140	65900
Hemiphractidae	<i>Gastrotheca</i> sp.	26595	-
	<i>Gastrotheca</i> sp.	26750	-
	<i>Gastrotheca</i> sp.	26751	65931
	<i>Gastrotheca</i> sp.	26752	65932

Tabla 3. Especies de anfibios de los que se obtuvo secreciones cutáneas (Continuación)

Familia	Especie	Serie de campo	Número QCAZ
Hemiphractidae	<i>Gastrotheca</i> sp.	26753	-
	<i>Gastrotheca</i> sp.	27116	-
Hylidae	<i>Hypsiboas pellucens</i>	26692	65918
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	26697	65919
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	26704	-
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	26705	65921
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	27146	57781
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	27147	57782
	<i>Hypsiboas pellucens</i>	27148	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26702	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26703	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26706	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26923	65917
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26959	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	26960	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27142	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27144	65901
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27152	65903
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27153	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27154	65904
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27155	-
	<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	27156	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26681	57844
	<i>Smilisca phaeota</i>	26682	65933
	<i>Smilisca phaeota</i>	26683	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26684	65934
	<i>Smilisca phaeota</i>	26685	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26694	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26922	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26961	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	26962	-
	<i>Smilisca phaeota</i>	27150	-
	<i>Trachycephalus jordani</i>	27135	-
Ranidae	<i>Rana</i> sp.	26707	65922
Ranidae	<i>Rana</i> sp.	26708	-
Ranidae	<i>Rana</i> sp.	27141	-
Ranidae	<i>Rana</i> sp.	27143	57050
Ranidae	<i>Rana</i> sp.	27157	57052

Tabla 4. Registro de las pruebas bioquímicas para la confirmación de las especies de bacterias ATCC

	CITRATO	TSI	MR/VP	SIM	MILI	ÚREA	FA	MIO
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	A/A Gas ++	-	H ₂ S - Motilidad - Indol -	Motilidad - Lisina -	-	-	Motilidad - Ornitina +
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	A/A Gas +	-	H ₂ S - Motilidad + Indol -	Motilidad + Lisina +	-	-	Motilidad + Ornitina +
<i>Escherichia coli</i>	-	A/A Gas +	+	H ₂ S - Motilidad + Indol +	Motilidad + Lisina +	-	-	Motilidad + Ornitina +
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	A/A Gas +	-	H ₂ S - Motilidad - Indol -	Motilidad - Lisina +	+	-	Motilidad + Ornitina -
<i>Salmonella Enteritidis</i>	+	K/H ₂ S Gas -	+	H ₂ S + Motilidad + Indol -	Motilidad + Lisina +	-	-	Motilidad + Ornitina +
<i>Serratia marcescens</i>	+	K/A Gas poco	-	Motilidad + Indol -	Motilidad + Lisina +	-	-	Motilidad + Ornitina +

TSI, Triple Sugar Iron; MR/VP, Rojo de Metilo/Voges Proskauer; SIM, Sulfuro Indol Movilidad; MILI, Motilidad Lisina; FA, ; FA: Fenil Alanina; MIO, Movilidad Indol Ornitina; A, ácido; K, alcalino; H₂S, gas sulfídrico; +, prueba positiva; -, prueba negativa.

Tabla 5. Datos de origen de los aislados clínicos de *Serratia marcescens* analizados

Código del aislado	Origen	Fecha de aislamiento
CB-QCA 3420	Sangre	09/09/2010
CB-QCA 3421	Sangre	09/09/2010
CB-QCA 3422	Secreción traqueal	09/09/2010
CB-QCA 3423	Sangre	09/09/2010
CB-QCA 3424	Herida pierna	09/06/2010
CB-QCA 3425	Espujo	25/01/2011
CB-QCA 3426	Orina	05/11/2010
CB-QCA 3427	Sangre	05/11/2010
CB-QCA 3429	Herida tórax	05/11/2010
CB-QCA 3430	Úlcera de muslo	25/01/2011
CB-QCA 3431	Secreción traqueal	25/01/2011
CB-QCA 3432	Histopatología tibia	25/01/2011
CB-QCA 3433	Secreción herida tibia	25/01/2011
CB-QCA 3443	Neonato	21/06/2011
CB-QCA 3469	Sangre	09/03/2012
CB-QCA 3471	Sangre	25/04/2012
CB-QCA 3472	Sangre	25/04/2012
CB-QCA 3473	Muestra peritoneal	25/04/2012

Tabla 6. Datos de origen de los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* analizados

Código del aislado	Origen	Fecha de aislamiento
8a C-ORSA	Sec. absceso región mamaria	27/07/2004
11 aC-ORSA	Humor acuoso	27/09/2002
20 C-ORSA	Secreción absceso mano	20/11/2004
28 C-ORSA	Secreción absceso mano	04/02/2005
77 C-ORSA	Absceso de tejido blando	14/01/2006
80 C-ORSA	Sangre	17/01/006
81 C-ORSA	Espujo	20/01/2006
83 C-ORSA	Secreción absceso mama	24/01/2006
88 C-ORSA	Secreción oreja	20/03/2006
99 C-ORSA	Espujo	19/04/2006
103 C-ORSA	Absceso	04/05/2006
104 C-ORSA	Absceso	04/05/2006

Tabla 7. Número total de extracciones cutáneas realizadas

Especies de anfibios	Número de extracciones realizadas	Peso total obtenido del liofilizado en gramos
<i>Atelopus</i> sp.	75	0.0074
<i>Gastrotheca</i> sp.	11	0.015
<i>Hypsiboas pellucens</i>	9	0.0356
<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	30	1.027
<i>Rana</i> sp.	19	0.1929
<i>Oophaga sylvatica</i> (A y R)	69	0.0447
<i>Smilisca phaeota</i>	19	0.0365
<i>Trachycephalus jordani</i>	2	0.0076

TOTAL EXTRACCIONES: 234

Tabla 8. Diámetros del halo inhibición de las pruebas de difusión por disco en bacterias ATCC

	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 19606	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Atelopus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gastrotheca</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hypsiboas pellucens</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hypsiboas rosenbergi</i>	0	0	0	0	0	8 mm para 4000 µg/ml	9 mm para 4000 y 2000 µg/ml
<i>Rana</i> sp.	0	0	0	0	0	9 mm para 4000 µg/ml	12 mm para 4000 µg/ml, 11 mm para 2000 µg/ml y 10 mm para 1000 µg/ml
<i>Oophaga sylvatica</i> (A y R)	0	0	0	0	0	0	0
<i>Smilisca phaeota</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trachycephalus jordani</i>	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9. Medidas de absorbancia a 630 nm de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de la secreción de *Rana* sp. frente a cepas multirresistentes de *Serratia marcescens*

Código del aislado	BLANCO (MHB)	Control de crecimiento	4000 µg/ml	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.63 µg/ml	7.82 µg/ml
CB-QCA 3420	0,0376	0,4616	0,2335	0,2690	0,2923	0,3124	0,2787	0,3325	0,3079	0,3056	0,3130	0,3104
CB-QCA 3421	0,0353	0,3410	0,2985	0,2811	0,2773	0,3027	0,2994	0,3119	0,3202	0,3145	0,3042	0,3290
CB-QCA 3422	0,0357	0,3413	0,3435	0,3001	0,3380	0,3134	0,3097	0,3192	0,3229	0,3003	0,3217	0,3040
CB-QCA 3423	0,03833	0,3636	0,257	0,2475	0,2700	0,2557	0,3014	0,2809	0,3275	0,3206	0,3220	0,3110
CB-QCA 3424	0,0353	0,3710	0,3045	0,2445	0,2576	0,2547	0,3057	0,2959	0,3265	0,3180	0,3054	0,3250
CB-QCA 3425	0,0376	0,3800	0,2810	0,2641	0,3010	0,3064	0,3144	0,3135	0,3452	0,3276	0,3144	0,3424
CB-QCA 3426	0,0343	0,6076	0,3831	0,6105	0,6153	0,5914	0,5800	0,5765	0,5345	0,5366	0,6054	0,5757
CB-QCA 3427	0,0340	0,5596	0,3035	0,5165	0,5593	0,5137	0,5010	0,5072	0,5039	0,5053	0,5187	0,5477
CB-QCA 3429	0,0336	0,6273	0,4385	0,5685	0,5863	0,5890	0,5657	0,5889	0,6052	0,5793	0,5857	0,6014
CB-QCA 3430	0,0346	0,6416	0,3415	0,3061	0,6223	0,6117	0,5810	0,5529	0,5395	0,5256	0,5517	0,6210
CB-QCA 3431	0,0346	0,7063	0,4748	0,6241	0,6240	0,6510	0,6624	0,6349	0,5709	0,6126	0,6547	0,6737
CB-QCA 3432	0,0346	0,5970	0,2068	0,3528	0,383	0,4047	0,4257	0,4749	0,4742	0,4800	0,4797	0,4907
CB-QCA 3433	0,0346	0,5846	0,4208	0,5305	0,522	0,5017	0,4877	0,4829	0,4922	0,474	0,4797	0,4950
CB-QCA 3443	0,0350	0,5880	0,3098	0,4285	0,4616	0,4694	0,4654	0,4645	0,4392	0,433	0,4610	0,5094
CB-QCA 3469	0,0353	0,4566	0,3395	0,3615	0,3656	0,3590	0,3944	0,3555	0,3452	0,314	0,2907	0,3270
CB-QCA 3471	0,0350	0,5300	0,2983	0,3701	0,4393	0,4447	0,4500	0,4415	0,4062	0,4136	0,4137	0,4097
CB-QCA 3472	0,0346	0,4103	0,2825	0,3751	0,3836	0,3710	0,3540	0,3785	0,3309	0,3133	0,3334	0,3807
CB-QCA 3473	0,035	0,6006	0,4318	0,5498	0,5446	0,5410	0,5213	0,5109	0,4842	0,4483	0,4704	0,4761

Tabla 10. Medidas de absorbancia a 630 nm de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de la secreción de *Rana* sp. frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*

Código del aislado	Blanco (MHB)	Control de crecimiento	4000 µg/ml	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.63 µg/ml	7.82 µg/ml
8a C-ORSA	0,0366	0,1940	0,0775	0,0513	0,0680	0,0470	0,0426	0,0410	0,0406	0,0403	0,0386	0,0383
11a C-ORSA	0,0356	0,1360	0,073	0,0590	0,0550	0,0470	0,0423	0,0380	0,0376	0,0380	0,0390	0,1276
20 C-ORSA	0,0376	0,3550	0,0773	0,0700	0,07033	0,0643	0,0540	0,0483	0,0456	0,0436	0,0416	0,0413
28 C-ORSA	0,0363	0,3576	0,0803	0,0866	0,0663	0,0690	0,0586	0,0493	0,0695	0,0443	0,0405	0,0610
77 C-ORSA	0,0360	0,3973	0,0740	0,0700	0,0683	0,0540	0,0493	0,0416	0,0440	0,0383	0,0450	0,0636
80 C-ORSA	0,0370	0,3596	0,0833	0,0750	0,0783	0,0626	0,05633	0,0503	0,0485	0,0540	0,0405	0,0406
81 C-ORSA	0,0355	0,2967	0,0630	0,0615	0,0492	0,0430	0,0417	0,0415	0,0395	0,0397	0,0380	0,0367
83 C-ORSA	0,0357	0,4465	0,0665	0,0620	0,0540	0,0487	0,0477	0,0425	0,0402	0,0395	0,0370	0,0362
88 C-ORSA	0,036	0,3832	0,0725	0,06875	0,05975	0,0583	0,047	0,0613	0,0445	0,0383	0,039	0,0370
99 C-ORSA	0,0356	0,2236	0,0836	0,0593	0,0496	0,042	0,0393	0,037	0,0363	0,0346	0,035	0,0343
103 C-ORSA	0,0365	0,3465	0,071	0,0725	0,06075	0,051	0,048	0,0427	0,0417	0,0412	0,0405	0,0385
104 C-ORSA	0,0370	0,4027	0,0795	0,0785	0,06525	0,057	0,053	0,049	0,0485	0,0455	0,042	0,0397

Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* frente a la secreción de cutánea *Rana* sp.

Código del aislado	4000 µg/ml	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.63 µg/ml	7.82 µg/ml
8a C-ORSA	40%	26%	35%	24%	22%	21%	21%	21%	20%	20%
11a C-ORSA	54%	43%	40%	35%	31%	28%	28%	28%	29%	26%
20 C-ORSA	22%	20%	20%	18%	15%	14%	13%	12%	12%	12%
28 C-ORSA	22%	24%	19%	19%	16%	14%	12%	12%	11%	17%
77 C-ORSA	19%	18%	17%	14%	12%	10%	11%	10%	11%	16%
80 C-ORSA	23%	21%	22%	17%	16%	14%	13%	4%	11%	11%
81 C-ORSA	21%	21%	17%	14%	14%	14%	13%	13%	13%	12%
83 C-ORSA	15%	14%	12%	11%	11%	10%	9%	9%	8%	8%
88 C-ORSA	19%	18%	16%	15%	12%	16%	12%	10%	10%	10%
99 C-ORSA	37%	27%	22%	19%	18%	17%	16%	15%	16%	15%
103 C-ORSA	21%	21%	18%	15%	14%	12%	12%	12%	12%	11%
104 C-ORSA	20%	19%	16%	14%	13%	12%	12%	11%	10%	10%

Tabla 12. Perfil de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a antibióticos y a la secreción cutánea de *Rana* sp.

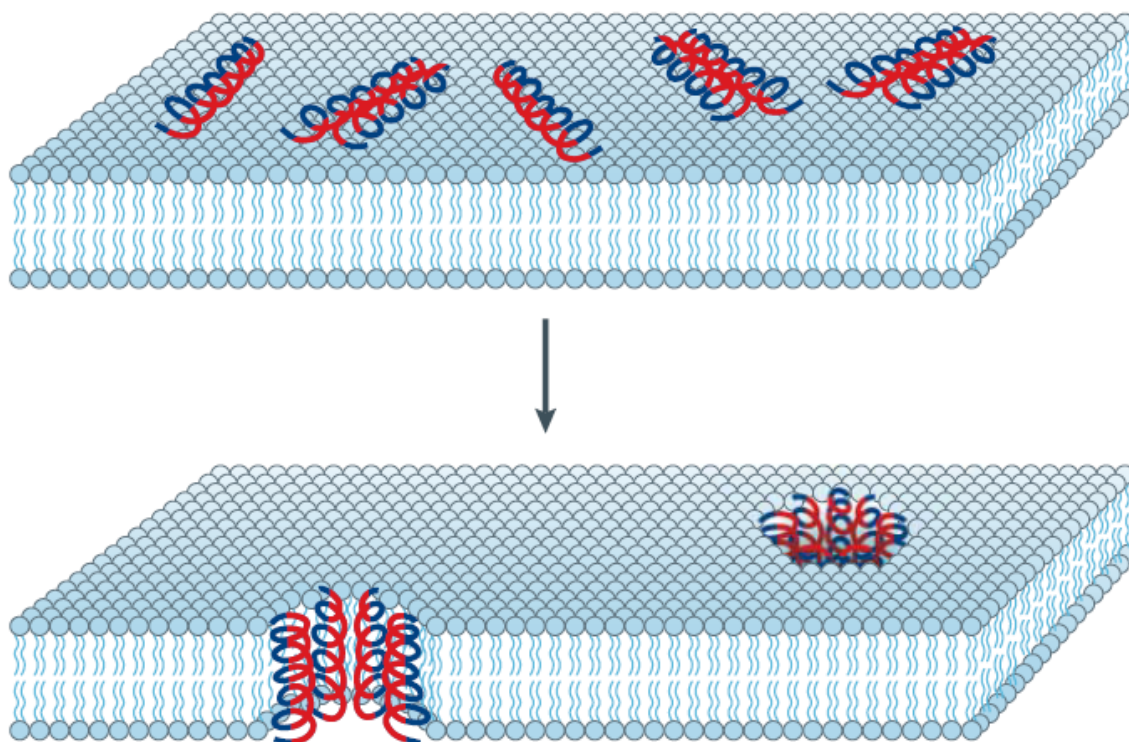
Aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	ÁCIDO NALIDÍXICO	AMOXICILINA	AMPICILINA	AZITROMICINA	CEFALEXINA	CEFOXITINA	CEFRADINA	CIPROFLOXACINA	CLINDAMICINA	CLOXACILINA	ERITROMICINA	GENTAMICINA	NETILMICINA	NOVOBIOCINA	OXACILINA	PENICILINA	RIFAMPICINA	TETRACICLINA	TRIMETOPRIM- SULFAMETAZOL	VANCOMICINA	SECRECIÓN
8a C-ORSA	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S
11a C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
20 C-ORSA	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S
28 C-ORSA	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
77 C-ORSA	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
80 C-ORSA	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
81 C-ORSA	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88 C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
99 C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
103 C-ORSA	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S

Tabla 13. Porcentaje de hemólisis de la secreción de *Rana* sp., en muestras sanguíneas de hombre y mujer

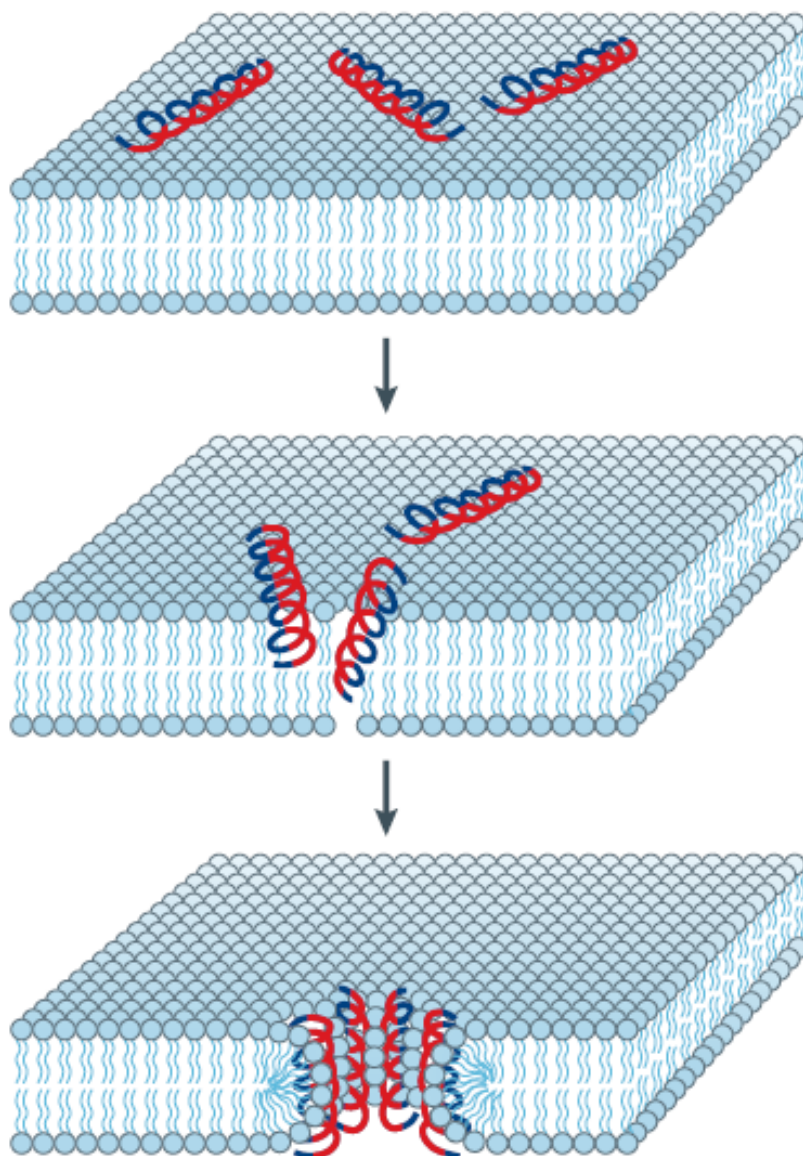
	Control (+) hemólisis	4000 µg/ml	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.63 µg/ml	7.82 µg/ml	Control (-) hemólisis
HOMBRE	100,00%	93,37%	93,12%	98,30%	82,24%	5,20%	3,65%	2,87%	3,05%	2,76%	2,87%	2,88%
MUJER	100,00%	86,49%	87,16%	87,97%	65,64%	4,91%	2,87%	2,64%	2,96%	2,73%	2,84%	2,88%

11. ANEXOS

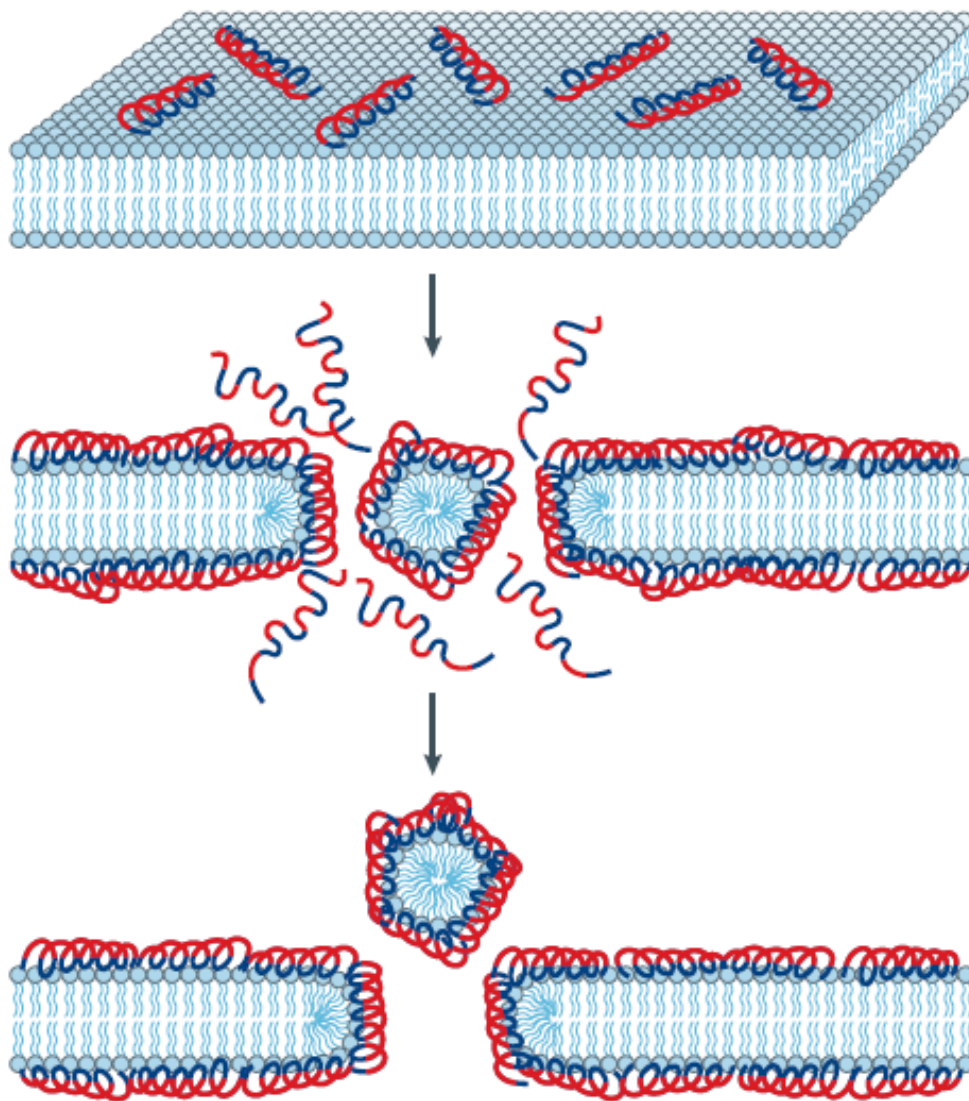
Anexo 1. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de poro de barril. Las regiones hidrófilas del péptido se muestran en color rojo, las regiones hidrófobas del péptido se muestran en color azul. (Tomado de Brodgen, 2005)



Anexo 2. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de formación de poro toroidal. Las regiones hidrófilas del péptido se muestran en color rojo, las regiones hidrófobas del péptido se muestran en color azul. (Tomado de Brodgen, 2005)



Anexo 3. Modelo de acción de los péptidos antimicrobianos según el modelo de alfombra. Las regiones hidrófilas del péptido se muestran en color rojo, las regiones hidrófobas del péptido se muestran en color azul. (Tomado de Brodgen, 2005).



Anexo 4. Permiso de investigación científica N° 005-14 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 005-14 IC-FAU-DNB/MA

FLORA

FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a Alvaro Barragán Documento de Identidad cédula No. 1711585511, Santiago Burneo Documento de Identidad cédula No. 1711685816, Santiago Ron Documento de Identidad cédula No. 1706893300, Omar Torres Carvajal Documento de Identidad cédula No. 1706360987, José Luis Rivera Parra Documento de Identidad cédula No. 1716763782 de nacionalidad ecuatoriana, para que lleven a cabo la investigación "Plan General de Colecta Museo de Zoología QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de: Mercedes Rodríguez M.Sc. Directora Escuela de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
2. Valoración técnica del proyecto: Gabriela Montoya. Dirección Nacional de Biodiversidad.
3. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna.
4. Auspicio de Institución Científica Nacional: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Nacional de Biodiversidad y Direcciones Provinciales del Ministerio del Ambiente.
6. Complementos Autorizados de la Investigación: 6.1. Investigación en muestras Zoológicas: Invertebrados, Anfibios, Reptiles, Aves, Mamíferos.
7. Duración: 03 febrero 2014 al 03 de febrero de 2015.
8. Obligaciones del investigador: SE COMPROMETE A DEPOSITAR DUPLICADOS DE LOS ESPECÍMENES DE ESTA INVESTIGACIÓN EN UNA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE: MUSEO QCAZ DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR PATENTE No. 09-2013-FAU-OPAP-MA; ENTREGAR 2 (DOS) COPIAS DEL INFORME FINAL: 1 (UNA) COPIA A CADA UNA DE LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN y 1 (UNA) COPIA A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD, EN ESPAÑOL, IMPRESO Y DIGITAL EN FORMATO PDF; ENTREGAR LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS U OBSERVADOS, UNA COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS QUE FORMEN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN EN FORMATO DIGITAL AL MINISTERIO DEL AMBIENTE Y CUMPLIR CON TODOS LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS POR NUMERALES EN LA PARTE POSTERIOR DE ESTA AUTORIZACIÓN. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME VENCE EL 03 DE FEBRERO DEL 2015.
9. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a: Alvaro Barragán, Santiago Burneo, Santiago Ron, Omar Torres Carvajal, José Luis Rivera Parra Investigadores y Mercedes Rodríguez Directora Escuela de Ciencias Biológicas, PUCE.

Francisco Prieto
Director Nacional de Biodiversidad

OM:05/02/14
CC: Coordinadores de Patrimonio Natural
Responsables de Vida Silvestre

Anexo 4. Permiso de investigación científica N° 005-14 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente (Continuación)

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

10. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS APROBADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN POR TANTO NO HABILITA EXPORTACIÓN, MOVILIZACIÓN O MANEJO DE FAUNA SIN EL CORRESPONDIENTE PERMISO.
11. SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS DE AZUAY, BOLIVAR, CAÑAR, CARCHI, CHIMBORAZO, COTACACHI, EL DORADO, ESMERALDAS, GUAYAS, IMBABURA, LOJA, LOS RIOS, MANABI, MORONA SANTIAGO, NAPO, ORELLANA, PASTAZA, PICHINCHA, SUCUMBIOS, TUNGURAHUA Y ZAMORA CHINCHIPE.
12. SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN DE MUESTRAS ZOOLOGICAS: Invertebrados, Anfibios, Reptiles, Aves, Mamíferos CON EL PROPÓSITO DE:

- 13.1 Colección de especímenes
- 13.2 Inventario de especies faunísticas
- 13.3 Descripción de nuevas especies
- 13.4 Documentar distribución geográfica y variación específica de especies
- 13.5 Desarrollar sistemas biotecnológicos

13. SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN

EQUIPO	MATERIALES
GPS	Redes de Neblina
Cámara fotográfica	Trampas: Pitfall, Sherman, Tomahawk, arpa, de galletas, etc. Mosquero, Wirecage
Linternas	Insecticida piretroide
	Frascos de colección
	Cajas de plástico, de madera

16. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO, DESDE EL NÚMERO 0000-005-14 IC-FAU-DNB/MA HASTA 0000-005-14 IC-FAU-DNB/MA, BASADO EN LA SOLICITUD DE INVESTIGACIÓN.
17. LOS INDIVIDUOS QUE SE DESTINAN PARA COLECCIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN, DEBERÁN SER PRESERVADOS, CUIDADOS Y DEPOSITADOS EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 8 DE ESTA AUTORIZACIÓN, QUE CERTIFICARÁ EL INGRESO A SU COLECCIÓN.
18. EN EL CASO DE ENCONTRARSE NUEVAS ESPECIES, DEBERÁ NOTIFICARSE A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD LA DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE ADJUNTANDO LA RESPECTIVA PUBLICACIÓN. LOS ESPECÍMENES TIPO DEBERÁN DEPOSITARSE EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 8 DE ESTA AUTORIZACIÓN.
19. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.
20. LOS RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER ENTREGADOS AL MINISTERIO DEL AMBIENTE CONFORME LO ESTABLECE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL VIGENTE.
21. NINGÚN ESPÉCIMEN PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN PODRÁ SER UTILIZADO PARA USO COMERCIAL SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
22. ESTAS MUESTRAS NO PODRÁN SER UTILIZADAS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
23. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRIBUIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
24. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
25. EL REGISTRO DE LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS U OBSERVADOS ASÍ COMO FOTOGRAFÍAS, INFORME PARCIAL O FINAL DEBERÁ SER ENTREGADO EN FORMATO DIGITAL, PDF, PARA SU INGRESO AL SISTEMA DE INFORMACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE, INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE LAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS Y PARA A LA PÁGINA WEB DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
26. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMÁS NORMATIVA PERTINENTE.
27. TASA POR AUTORIZACIÓN: VEINTE DÓLARES DEPOSITADOS CON PAPELETA N° 498756818 DEL 03 DE FEBRERO DEL 2014 EN EL BANCO NACIONAL DE FOMENTO CUENTA 0019000765.

Anexo 5. Permiso de investigación científica N° 003-15 IC-FAU-DNB/MA del Ministerio del Ambiente



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 003-15 IC-FAU-DNB/MA

FLORA

FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

Investigador	C.I/ Pasaporte	Nacionalidad
Alvaro Barragán	1711585511	Ecuatoriana
Santiago Burneo	1711585816	Ecuatoriana
Santiago Ron	1711056137	Ecuatoriana
Omar Torres Carvajal	1712335916	Ecuatoriana

Para realizar la investigación: Plan General de Colección del Museo de Zoología OCAZ, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de: Mtr. Mercedes Rodríguez, Directora de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
2. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural, Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales y Dirección Nacional de Biodiversidad establecidos en la parte inferior de esta Autorización.
3. Inicio de investigación: 12 de febrero de 2015 hasta 12 de febrero del 2016.
4. Entrega de informe final 12 de febrero 2016.
5. Valoración técnica del proyecto: Paul Aulestad Dirección Nacional de Biodiversidad.
6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el permiso que deberá obtenerse en la correspondiente Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente.
7. Estas muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de bioprospección ni acceso a recurso genético sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente.

Complementos Autorizados de la Investigación

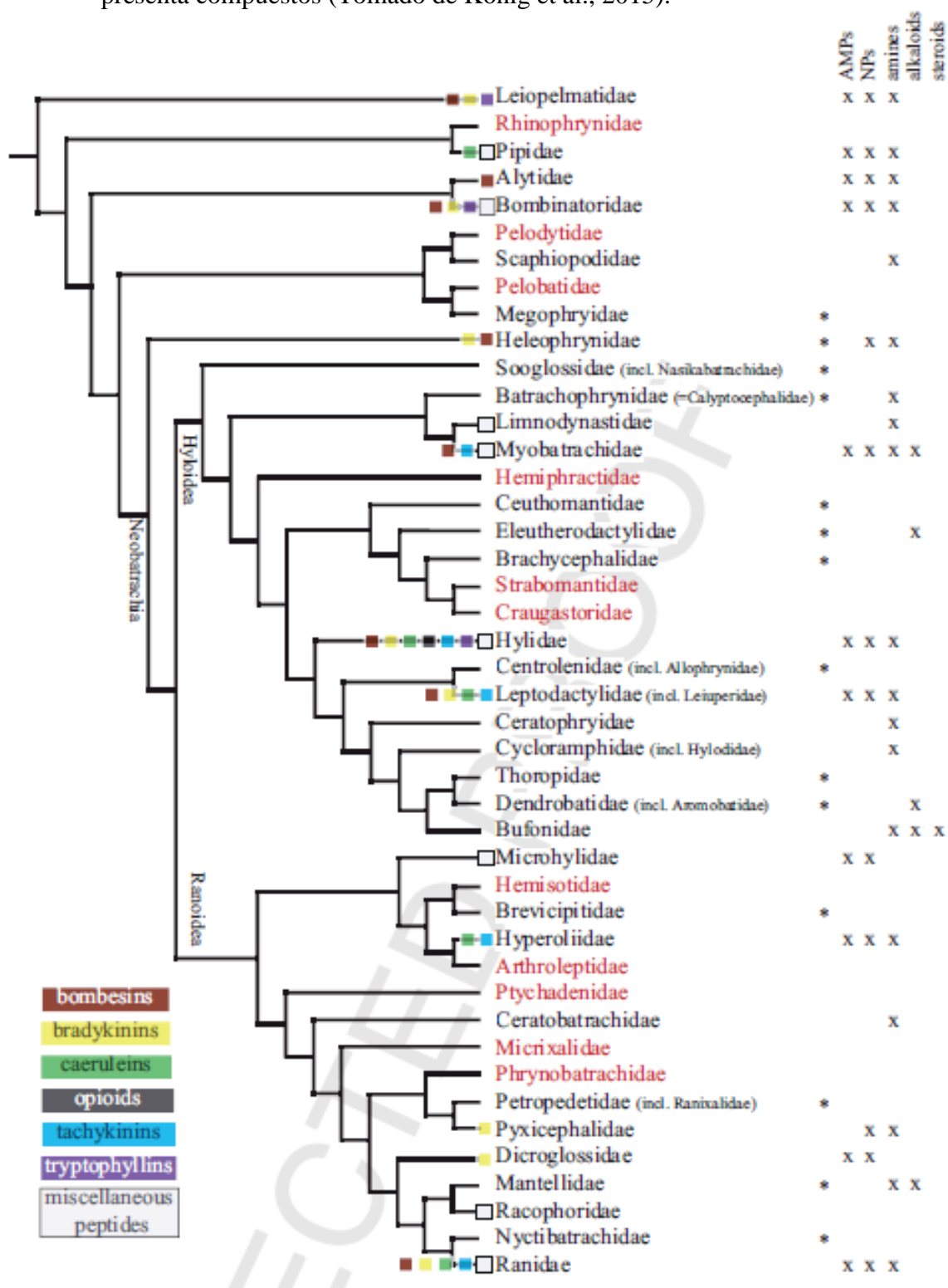
8. Investigación en muestras Zoológicas: Invertebrados, Anfibios, Reptiles, Mamíferos.

Obligaciones del investigador

9. Entregar al Ministerio del Ambiente-DNB, (02) dos copia del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final en la DNB).
10. Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión.
11. Lista taxonómica de las especies debidamente identificadas, objeto de la autorización con sus respectivas coordenadas.
12. Entregar una copia de los resultados de su trabajo, a cada una de las áreas protegidas o Direcciones Provinciales donde se realizó la investigación.
13. Depositar los especímenes producto de esta investigación en una unidad de manejo autorizada por el Ministerio del Ambiente, los muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.
14. Entregar a la dirección Nacional de Biodiversidad el certificado del depósito de las muestras emitido por una institución científica ecuatoriana depositaria de material biológico.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los números 10, 11,12, 13, 14 se responsabiliza a: Alvaro Barragán, Santiago Burneo, Santiago Ron, Omar Torres Carvajal, Investigadores y Mercedes Rodríguez Directora Escuela de Ciencias Biológicas, PUCE

Anexo 6. Filogenia de anfibios que muestra la distribución de compuestos presentes en su piel. Familias en rojo han sido investigadas, pero aparentemente no presenta compuestos (Tomado de König et al., 2015).



AMPs: péptidos antimicrobianos; NPs: péptidos neuroactivos; x, compuesto reportado para esta familia; *, no investigado hasta el momento para AMPs.

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Miguel Angel Llumiquinga Llumiquinga, autor del trabajo de graduación intitulado: “Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos sobre cepas bacterianas tipo y aislados clínicos multirresistentes”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 25 de enero de 2017

Miguel Angel Llumiquinga Llumiquinga
C.I. 1719080275